

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STUDIUM INTRONOVÝCH POLYMORFIZMŮ PRO
IDENTIFIKACI POHLAVNÍCH CHROMOZÓMŮ U
*XENOPUS TROPICALIS***

**STUDY OF INTRONIC POLYMORPHISMS FOR THE
IDENTIFICATION OF SEX CHROMOSOMES IN
*XENOPUS TROPICALIS***

EVA SEIFERTOVÁ

PRAHA 2008

Vedoucí diplomové práce:
RNDr., Ing. Vladimír Krylov, PhD.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních pramenů a pod vedením vedoucího diplomové práce, RNDr., Ing. Vladimíra Krylova, PhD.

PRAHA, SRPEN 2008, EVA SEIFERTOVÁ.....

**DĚKUJI VEDOUCÍMU DIPLOMOVÉ PRÁCE RNDR. ING. V. KRYLOVOVI, PH.D. A
RNDR. J. MÁCHOVI ZA CENNÉ RADY, PŘIPOMÍNKY A METODICKÉ VEDENÍ
PRÁCE.**

PŘEHLED KAPITOL

3

1. Úvod	9
1.1. Abstract	10
3. Literární přehled	12
3.1. Modelové organizmy	12
3.1.1. Rod <i>Xenopus</i> - Systematické zařazení.....	12
3.1.1.1. Počet chromozómů a ploidita u rodu <i>Xenopus</i>	12
3.1.2. <i>Xenopus laevis</i>	12
3.1.2.1. Ploidie a genom	13
3.1.2.2. <i>Xenopus laevis</i> jako modelový organizmus	13
3.1.3. <i>Xenopus tropicalis</i>	14
3.1.3.1. Genom	15
3.1.3.2. Genomické projekty	16
3.1.3.3. Současné zmapování genomu	16
3.2. Metody mapování genomu	17
3.2.1. Vazebné mapování	17
3.2.2. Genetické markery.....	18
3.2.2.1. AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism	18
3.2.2.2. RAPD Random Amplified polymorphic DNA	19
3.2.2.3. RFLP Restriction fragment lenght polymorphism	19
3.2.2.4. SSLP: Simple Sequence Lenght Polymorphism	20
3.2.2.4.1. Minisatelite	20
3.2.2.4.1. Mikrosatelite.....	21
3.2.2.5. SNP: Single-nucleotid polymorphism.....	23
3.2.2.6. Intronové polymorfismy	23
3.2.2.7. RH panel- radiační panel	24
3.2.3. Vazebná mapa <i>X. tropicalis</i>	25

3.2.3.1. Vazebná mapa vytvořená pomocí SSR markerů	25
3.2.3.1.1. Strategie mapování	26
3.2.3.2. Vazebná mapa získaná pomocí AFLP markerů	27
3.2.3.2.1. Strategie mapování	27
3.2.4.1. Analýzy dat.....	28
3.2.4.1.1. LOD Score.....	28
3.2.4.1.2. Vazebná nerovnováha	29
3.2.2. Fyzické mapování genomu	30
3.2.2.1. Vztah vazebné a fyzické mapy	30
3.2.2.2. ISH.....	31
3.2.2.3. FISH	32
3.2.2.3.1. Typy FISH sond	32
3.2.2.3.2. Způsoby značení FISH sond.....	33
3.2.2.4. Amlifikace signálu	33
3.2.2.4.1. CARD (Catalyzed Reporter deposition).....	34
3.2.2.4.2. In Situ PCR.....	35
3.2.2.4.3. PRINS (Primes In Situ)	36
3.2.2.5. Fyzické mapování nevyužívající FISH techniky	36
3.2.2.5.1. Fyzické mapování pomocí restrikčních enzymů	37
3.3. Určení pohlaví.....	37
3.3.1. Vznik systémů určení pohlaví	37
3.3.2. Vznik pohlavních chromozómů	38
3.3.3. Geny vázané na pohlaví a pohlavím omezená exprese genů	39
3.3.3.1. Geny s doménou DM	40
3.3.3.2. RBMX, RBMY.....	41
3.3.3.3. Sox geny	42
3.3.3.3.1. SRY	43
3.3.3.3.2. SOX 9	43
3.3.4. Určení pohlaví u obojživelníků	44

3.3.4.1. <i>Xenopus laevis</i>	45
3.4. Syntenie	46
3.4.1. Srovnávací genové mapování.....	47
3.4.2. ZOO FISH	48
4. Materiál	50
4.1. Žáby	50
4.2. Roztoky.....	50
4.3. Kity	50
4.4. Přístroje.....	51
4.5. Primery.....	51
5. Metody	56
5.1. Navržení primerů pro PCR.....	56
5.2. Odběr krve	56
5.3. Izolace DNA z krve	57
5.4. Izolace DNA z tkání	57
5.5. Izolace DNA z agarózového gelu.....	58
5.6. Long PCR (polymerase chain reaction)	59
5.7. Restrikce	60
5.8. Kontrolní elektroforéza	60
5.9. Izolační elektroforéza	61
5.10. Měření koncentrace DNA	61
5.11. Umělé oplození.....	61
5.11.1. Izolace varlat	61
5.11.2. Získání oocytů a umělé oplození.....	62
5.12. Pulci	62
5.13. Dospělí jedinci.....	62
6. Výsledky	63
6.1. Strategie nalezení vhodných vazebných skupin pro identifikaci genu určujícího pohlaví	63

6.1.1. LG 5.....	63
6.1.2. LG6.....	64
6.1.3. LG7.....	65
6.2. Strategie vyhledávání intronů pro vazebné mapování	66
6.3. Identifikace vhodných restriktáz	67
6.4. Intronové polymorfizmy.....	68
6.5. Identifikace heterozygotů	70
6.6. Křížení	74
7. Diskuze.....	76
7.1. Intronové polymorfizmy.....	76
7.2. Využití intronových polymorfizmů při hledání typu určení pohlaví.....	78
7.3. Pohlavní chromozóm a gen určující pohlaví	80
8. Závěr	81
9. Citovaná literatura	82

1. ÚVOD

STUDIUM INTRONOVÝCH POLYMORFIZMŮ PRO IDENTIFIKACI POHLAVNÍCH CHROMOZÓMŮ U *XENOPUS TROPICALIS*

Xenopus tropicalis je významným modelovým organizmem vývojové biologie. Jeho genom je osekvenován. Byla vytvořena vazebná mapa založená na SSR (Single Sequence Repeat) polymorfních markerech. V současné době je zatím neúplná a obsahuje řadu nepřesností. Běžně používané genetické markery založené na repetitivních sekvencích nejsou rozmístěny v genomu rovnoměrně a velké oblasti chromozómů tudíž zůstávají vazebně nezmapované. Tento problém by mohly vyřešit markery založené na polymorfismu intronových sekvencí. Pro jejich možné použití je zapotřebí provést studii, která stanoví jejich frekvenci v genomu a potvrzující možné použití při křížení a tudíž i vazebném mapování.

Přes velký význam nejsou u druhu *Xenopus tropicalis* zatím známy žádné geny vázané na pohlaví a dokonce i samotné určení pohlaví je zatím nejasné. Gynogenetické studie vedoucí k určení pohlaví přináší rozpolupné výsledky, proto je třeba navrhnout jiný systém umožňující zjištění určení pohlaví a především nalezení pohlavních chromozómů. I k tomuto účelu by mohly posloužit intronové polymorfizmy.

Klíčová slova:

Intronové polymorfizmy/ Vazebné mapování/ Genetické markery/Typ určení pohlaví/ Geny určující pohlaví/ *Xenopus tropicalis*

1.1. ABSTRACT

STUDY OF INTRONIC POLYMORPHISMS FOR THE IDENTIFICATION OF SEX CHROMOSOMES IN *XENOPUS TROPICALIS*

Xenopus tropicalis is a significant model organism of developmental biology. Its genome was sequenced. Linkage map based on SSR (Single Sequence Repeat) polymorphic markers was established. The map is still incomplete and contains a lot of inaccuracies. Currently used genetics markers based on repetitive sequences are not spread equally, hence some parts of chromosomes are not genetically mapped. This problem could be solved by polymorphism of intron sequences. To prove its possible application it is necessary to determine its frequency in genome and confirm its utilization in crossbreeding and consequently in linkage mapping.

Beyond its great importance any sex linkage genes are not known in *Xenopus tropicalis* species, and even a sex type determination is not clear. Gynogenetic studies leading to the determination of sex type produce different accomplishment. Therefore, it is important to create different system enabling sex type determination and, most importantly, to determine the sex chromosomes. Intrinsic polymorphisms could serve even this purpose.

Keywords:

Intron polymorphisms/ Linkage mapping/ Genetic marker/ Sex determination/ Sex gene /*Xenopus tropicalis*

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce byla studie intronových polymorfizmů u druhu *Xenopus tropicalis* jako možných genetických markerů pro vazebné mapování. Hlavní důraz byl kladen na markery s potenciální vazbou na pohlavní chromozomy.

1. Identifikace kandidátních pohlavních chromozómů u *Xenopus tropicalis*
2. Identifikace vhodných genových markerů v rámci kandidátních vazebných skupin
3. Identifikace vhodných restričních endonukleáz poskytujících intronový polymorfizmus u vybraných jedinců
4. Identifikace intronových polymorfizmů vhodných pro vazebné mapování
5. Provedení křížení vybraných rodičů a založení F1 generace

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. MODELOVÉ ORGANIZMY

Již století jsou embrya obojživelníků nejoblíbenějším modelem pro pochopení raného embryonálního vývoje. Hlavními důvody jsou především vnější oplození a zárodečný vývoj a relativně velká embrya. Ta umožňují použití mikročirurgických a mikromanipulačních technik. Většina raných experimentů byla provedena na embryích skokana (*Rana*), čolka (*Triturus*) a mloka (*Ambystoma*). Od padesátých let se stal nejvíce používaným modelem *Xenopus laevis* (jihoafrická drápatka vodní). U tohoto druhu však nebylo možné použití genetických studií. To se změnilo poté, co se začal používat blízký příbuzný druh *X.laevis*, *Xenopus tropicalis*.

3.1.1. Rod *Xenopus*- Systematické zařazení

Do rodu *Xenopus* řadíme tzv. drápkaté žáby. Toto označení pochází z anglického Clawed frogs. Systematicky jsou řazeny do čeledi *Pipidea* a podčeledi *Xenopodinae* (DE SA AND HILLIS 1990; CANNATELLA a DE SA 1993).

3.1.1.1. Počet chromozómů a ploidita u rodu *Xenopus*

Duplikace genomu proběhla u několika zástupců ryb i obojživelníků, včetně některých zástupců rodu *Xenopus*. Tento rod zahrnuje téměř dvacet samostatných druhů, které jsou všechny, s výjimkou jednoho (*Xenopus tropicalis*), polyploidní. Ploidie dosahuje rozpětí od tetraploidie (4N) po dodekapolidii (12N) (GRAF a KOBEL 1991, CANNATELLA a DE SA 1993).

3.1.2. *Xenopus laevis*

3.1.2.1. Ploidie a genom

Xenopus laevis byl prvním zástupcem rodu *Xenopus*, který byl velmi intenzivně zkoumán (TYMOWSKA A KOBEL, 1972). Stal se standardem pro srovnávání ostatních zástupců. Na základě karyotypové morfologie a formování bivalentů v průběhu meiózy byl zařazen mezi diploidní druhy. Následující studie však ukázaly, že původní linie *X. laevis* prodělaly duplikaci genomu (BISBEE et al., 1977) a tento druh je alotetraploidního původu (Graf and Kobel, 1991; CANNATELLA a DE SA, 1993). To znamená, že vznikl křížením, v němž byly zachovány oba rodičovské genomy. Tento fakt je potvrzován při izolaci nových genů, kdy je velmi často popisována přítomnost dvou paralogů. Funkčně je však *X. laevis* již z větší části diploidizován a duplikované geny mají na sobě nezávislou dědičnost (GRAF, 1989). Také je známo několik desítek recesivních mutací projevujících se s frekvencí, kterou lze očekávat u diploidního organismu (GRAF, 1989). Funkční diploidii potvrzuje i skutečnost, že experimentálně vytvořená embrya s 18-ti chromozómy nejsou životaschopná (HAMILTON, 1963). Nevýhody alotetraploidie vedly u molekulárně genetického výzkumu k přesunutí pozornosti na příbuzný druh *Xenopus tropicalis*.

Cytologicky byl *X. laevis* popsán jako funkční diploid alotetraploidního původu s 36 chromozomy a 18 bivalenty. Většina jeho chromozomů může být uspořádána do kvartetů podle jejich podobných replikačních profilů (SCHMID a STEINLEIN, 1991). Genom je velký přibližně $3,1 \times 10^9$ bp (THIEBAUD a FISCHBERG, 1977).

3.1.2.2. *Xenopus laevis* jako modelový organizmus

Díky následujícím výhodám se stal ve třicátých letech dvacátého století *Xenopus laevis* často používaným laboratorním zvířetem:

- 1) je vodní zvíře a může být snadno chováno v akváriu;
- 2) narozdíl od většiny jiných obojživelníků se krmí „mrtvým“ organickým materiálem;

3) je velmi tolerantní a má široké rozmezí podmínek k životu;

4) u samice je snadno navoditelná ovulace injekcí gonadotropinu, a to kdykoli v průběhu roku. Tento objev se stal ve třicátých letech základem pro jednoduchý těhotenský test a vedl k celosvětovému rozšíření a používání druhu *X.laevis* (BELLERBY, 1934; SHAPIRO a ZWARENSTEIN, 1934).

V padesátých a šedesátých letech byly vyvinuty citlivější metody pro zjištění těhotenství a *X. laevis* nebyl již pro tyto účely potřeba. Tou dobou již byla jeho embrya používána jako velmi dobrý model vývojové biologie. Pro genetické a některé molekulární studie není však *X. laevis* ideálním systémem. Důvodem je jeho polyploidie.

Buněčně biologické studie provedené na tomto systému objasnily mechanismy kontroly buněčného cyklu, cytoskeletární mechaniky, replikace chromozómů, signalizace a mnoho dalších (shrnutí v AMAYA et al, 1998).

3.1.3. *Xenopus tropicalis*

Xenopus tropicalis je jediný diploidní druh rodu *Xenopus*. Podle karyotypických, morfologických a molekulárních studií je *X. tropicalis* samostatný, nicméně evolučně blízký druh *X. laevis* (BISBEE et al., 1977; CANNATELLA a DE SA, 1993). Současné morfologické studie porovnávající *X. tropicalis* s dalšími žábami z čeledi Pipidae ukazují, že může být *X. tropicalis* evolučně více spřízněný s *Hymenochirus* než s *X. laevis*.

Několik vlastností činí z *X. tropicalis* ideální model pro vývojovou biologii, plynoucí především z podobnosti s *X. laevis*. Dospělí jedinci obou druhů mají velmi podobnou morfologii, nicméně *X. tropicalis* je značně menší. Sdílí rovněž všechny výše uvedené výhody *X. laevis*, kromě toho je haploidní genom *X.tropicalis* (1,78 pg či $1,7 \times 10^9$ bp) téměř o polovinu menší, než genom *X.laevis* (3,2pg či $3,1 \times 10^9$ bp) (TYMOWSKA, 1973). Dále je genom *X. tropicalis* tvořen dvaceti chromozómy, oproti 36 chromozómů u *X. laevis* (TYMOWSKA, 1973). Mezi obojživelníky má *X. tropicalis* jeden z nejmenších genomů- například velikost genomu mloka kolísá a je

17-96 x větší, než je tomu u *X. tropicalis*. V porovnání s dalšími modelovými organizmy, je genom *X. tropicalis* poloviční v porovnání s myší a srovnatelný s genomem zebřičky.

Kromě malého genomu a diploidie, má *X. tropicalis* i další výhody. Má relativně krátkou generační dobu (4-6 měsíců), která může být v optimálních laboratorních podmínkách ještě zkrácena. Pro porovnání, generační doba *X. laevis* je 1-2 roky. Ve skutečnosti má *X. tropicalis* možná nejkratší generační dobu ze všech obojživelníků (DUELLMAN, 1992). *X. tropicalis* je rovněž výrazně menší než *X. laevis*, což umožňuje chov většího množství jedinců na srovnatelně velkém prostoru. I přes malé rozměry může samice *X. tropicalis* naklást 1000-3000 vajíček při jedné ovulaci. Emrya *X. tropicalis* jsou v porovnání s embyi *X. laevis* menší (0,7-0,8 mm oproti 1,0-1,3 mm), ale jsou dostatečně velká na to, aby na nich mohly být prováděny obdobné manipulace, jako u *X. laevis*.

Kvůli blízké příbuznosti těchto dvou druhů mnoho jejich genových sekvencí prokazuje homologii, což bylo dokázáno in-situ hybridizací (AMAYA et al, 1998). Všechny tyto skutečnosti činí z *X. tropicalis* model, u kterého mohou být kombinovány klasické embryonální techniky s moderními technikami molekulární biologie.

Značnou výhodou je, že mnoho sekvencí je mezi oběma druhy vysoce konzervováno a molekulární přístupy vyvinuté u *X. laevis*, stejně jako nashromážděná data z EST a cDNA knihoven (AMAYA et al., 1998), RNA sondy či protilátky (KHOKHA et al., 2002) je možno použít i pro model *X. tropicalis*.

3.1.3.1. Genom

X. tropicalis má genom o velikosti přibližně $1,7 \times 10^9$ bp (THIEBAUD a FISCHBERG, 1977), což je přibližně polovina velikosti genomu *X. laevis*. Karyotyp se skládá z 20 mitotických chromozómů, které jsou identifikovatelné na základě poměru délky p a q ramen (TYMOWSKA, 1973).

3.1.3.2. Genomické projekty

Xenopus tropicalis je v současné době jedním z nejdůležitějších modelových obratlovčích organismů ve vývojové a buněčné biologii, proto je ze strany The National Institutes of Health (NIH) snaha osekvenovat jeho genom. (<http://www.nih.gov/science/models/Xenopus>; <http://tropicalis/berkeley.edu/home>). Kompletní sekvenování a zmapování genomu umožní komplexní objasnění genetických mechanismů kontrolujících buněčný cyklus a vývojové procesy, identifikaci mutací pozičním klonováním, ale také poskytne nezbytné informace pro evoluční studie.

V současné době běží řada projektů majících za cíl osekvenovat jeho genom (<http://faculty.virginia.edu/xtropicalis/GenomeBACintro.html>). Dále jsou generovány EST sekvence, BAC (z angl. Bacterial Artificial Chromosome), PAC (P1 Artificial Chromosome) a cDNA knihovny (KLEIN et al., 2002). K dispozici jsou inbrední linie IC (Ivory Coast) a N (Nigerian) kmenů, jejichž vzájemným křížením a analýzou potomstva vzniká vazebná mapa. Existence EST datábase umožnila zavedení chipové analýzy, které by mohly být vhodné pro charakterizaci mutací. Postup a aktuální vývoj genomického mapování *X. tropicalis* lze sledovat na webových stránkách <http://tropmap.biology.uh.edu/>. Pro konstrukci různých transgenních linií, jedné z BAC knihoven a také jako zdroj DNA pro sekvenační projekt genomu byli použiti jedinci nigerijského (N) kmene.

3.1.3.3. Současné zmapování genomu

Sekvence genomu *X. tropicalis* je podle nejnovější verze JGI 4.1 (2008) organizována do 19 501 scaffoldů, poskytujících přibližně osminásobné pokrytí genomu. Téměř polovina genomu je obsažena ve 272 scaffoldech. S postupem projektu sekvenace jsou data průběžně aktualizována (http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4_info.html).

3.2. METODY MAPOVÁNÍ GENOMU

3.2.1. VAZEBNÉ MAPOVÁNÍ

Vazebná mapa je charakterizována relativní polohou dvou a více lokusů na chromozomu. Je založená na principu frekvence rekombinace mezi dvěma lokusy během crossing-overu homologních chromozomů. Pozice lokusů je udávána v centimorganech. Jeden centimorgan odpovídá pravděpodobnosti rekombinace 1%. Čím je větší frekvence rekombinace mezi dvěma lokusy, tím se tyto lokusy fyzicky nacházejí dále od sebe.

Jako genetický marker slouží sekvence DNA, která je polymorfní a u jedinců náhodné populace se vyskytuje pokud možno v heterozygotním stavu.

První genetické mapy byly konstruovány ještě před objevením DNA pouze na základě fenotypových projevů genů. Vazebné mapy u bakterií nebo kvasinek byly vytvořeny na základě schopnosti biochemické detekce některých lokusů. U člověka byly sledovány alely určující krevní skupiny, varianty sérových proteinů nebo proteiny HLA systému (z angl. Human Leukocyte Antigens).

Vzhledem k tomu, že je velká část eukarotického genomu nekódující a jen některé geny se vyskytují v alelických formách, byly by vazebné mapy založené pouze na sledování genových lokusů velmi málo podrobné. Mapy s vyšším rozlišením mohly být konstruovány po objevení DNA markerů. Jako DNA marker je označován heterozygotní lokus pro neutrální změnu v sekvenci DNA, který se nepojí s rozpoznatelným fenotypem.

Z obecného hlediska lze DNA markery charakterizovat jako dominantní nebo kodominantní. Polymorfizmus dominantních markerů je detekován jako fragment konstantní délky, který u jedince buď je, nebo není amplifikován. Nelze tedy rozlišit, zda byl marker amplifikován z jedince homozygotního nebo heterozygotního. Dominantními markery jsou například polymorfizmy náhodně amplifikovaných DNA fragmentů. Kodominantní markery jsou identifikovány jako segmenty různé délky amplifikované z téhož lokusu. Tento druh markerů umožňuje

odlišit heterozygoty od homozygotů, a je tedy z pohledu analýzy segregace polymorfizmů výhodnější. Klasickým příkladem kodominantních markerů jsou délkové polymorfizmy restrikčních fragmentů.

V současné době existuje snaha vytvořit genetickou vazebnou mapu u *X. tropicalis* s pokrytím 1-5cM po celém genomu.

3.2.2. Genetické markery

3.2.2.1. AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

AFLP (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů) (VOS et al., 1995) je oblíbenou technikou používanou pro vytvoření velkého množství molekulárních markerů nutných pro konstrukci vazebných map. Výhodami této techniky jsou nízká cena, spolehlivost, opakovatelnost, a především jednoduchý návrh PCR primerů bez nutnosti předešlé znalosti sekvence. AFLP markery byly použity pro genetické mapování u několika různých organismů, například u myši (MACKILL et al., 1996), zebřičky (RANSOM a ZON, 1999) či kuřete (HERBERGS et al., 1999).

Základním principem techniky je selektivní amplifikace restrikčních fragmentů z kompletní genomové DNA. Prvním krokem je restrikce DNA a ligace oligonukleotidových adaptorů. Následuje selektivní amplifikace některých restrikčních fragmentů. Amplifikované fragmenty jsou nakonec analyzovány na denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Selektivní amplifikace je zajištěna použitím primerů, které přesahují restrikční fragmenty. Syntetizovány jsou pouze ty fragmenty, u nichž je přesahující oblast primeru komplementární k nukleotidům odpovídajícím sekvenci restrikčního místa.

AFLP umožňuje současnou specifickou amplifikaci vysokého počtu restrikčních fragmentů, nejčastěji 50-100, v závislosti na citlivosti použitého detekčního systému.

První vazebná mapa druhu *Xenopus tropicalis* byla sestavena pomocí markerů získaných touto technikou (KOCHAN et al., 2002).

3.2.2.2. RAPD Random Amplified polymorphic DNA

Technika RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfni DNA) je založena na amplifikaci náhodných segmentů DNA s použitím jednoho páru libovolných oligonukleotidových primerů (WILLIAMS et al., 1990). Tyto primery detekují polymorfismus v přítomnosti specifické nukleotidové sekvence, která je analyzována na agarózovém gelu.

V případě, že je pozměněna sekvence komplementární k primerům, lze touto technikou sledovat jednonukleotidové mutace. Dalšími zdroji polymorfie mohou být delece či inserce v místě nasedání primerů, nebo mutace měnící délku amplifikované DNA, která ovšem neovlivní ligaci primerů. Polymorfie uvnitř sekvence amplifikované DNA lze nalézt pomocí restričních endonukleáz a následné analýze fragmentů na gelu.

3.2.2.3. RFLP Restriction fragment lenght polymorphism

Metoda RFLP (dédkový polymorfismus restričních fragmentů) je nejstarší technikou pro získávání genetických markerů (GRODZICKER et al., 1974). Schéma techniky je následující: Restriční endonukleázy rozpoznají specifickou sekvenci v DNA a katalyzují endonukleolytické štěpení, které poskytuje různě dlouhé fragmenty. Restriční fragmenty jsou následně elektroforeticky analyzovány na agarózovém gelu. Tímto způsobem vzniká velké množství různě dlouhých fragmentů. Fragmenty kódující specifickou DNA mohou být detekovány hybridizací použitím Southernovy techniky (SOUTHERN, 1975). Při ní jsou fragmenty DNA přemístěny z agaróзовého gelu na nitrocelulózovou membránu, na kterém hybridizují s radioaktivně značenou sekvencí DNA.

Polymorfizmy mezi restričními fragmenty jsou většinou způsobeny důsledkem ztráty nebo naopak vzniku nového restričního místa. K tomu může dojít jedno- či vícenukleotidovou změnou v restričním místě, případně jeho delecí či jinou lokální přestavbou. Další možností je delece či inserce bloku nukleotidů, která

nezasahuje do restrikčního místa. Tento proces vede ke zkrácení, respektive k prodloužení restrikčního fragmentu.

3.2.2.4. SSLP: Simple Sequence Length Polymorphism

Velká část nekódujícího genomu je organizována do opakujících se sekvencí-minisatelitů (10-100 bp, většinou 9-30 bp) a mikrosatelitů (2-4 bp). Přestože je tato repetitivní DNA hojně rozšířena mezi všemi druhy organismů, nebyla zjištěna žádná jejich funkce. Mezi další repetitivní nekódující sekvence patří telomery, telomerám podobné sekvence a centromery.

Repetitivní sekvence na telomerách představují konce chromozómů. Tyto repetice zabráňují ztrátám kódující sekvence při replikaci DNA.

3.2.2.4.1. Minisatелity

Minisatелity jsou nekódující oblasti genomu s tandemově opakovanou sekvencí o velikosti do 100 bp (JEFFREYS et al., 1985). Počet lokusů minisatelitů v lidském genomu byl odhadnutý na 1500 na haploidní genom. Většina z lokusů vykazuje velké množství polymorfizmů v důsledku různého počtu repetice. Příčinou této genetické variability je hojnost mutací, která může dosáhnout i 10% na gametu (JEFFREYS et al., 1985). JEFFREYS et al. (1985) detekovali a vyvinuli DNA sondy, které jsou schopné simultánně vyhledat velké množství hypervariabilních lokusů minisatelitů. Hybridizace sond a následná elektroforéza DNA s těmito cílovými sekvencemi za nízké stringence vede k vytvoření vzorce fragmentů, které jsou pro každého jedince unikátní. Tyto vlastnosti mikrosatelitů jsou využívány v technice známé jako „fingerprintingová analýza“ (fingerprint angl. otisk prstu). Tato metoda má velké využití ve forensní medicíně, při hledání markerů pro vazebné mapy a při zjišťování příbuznosti mezi dvěma jedinci, včetně určování rodičovství.

Princip vyhledávání polymorfizmů minisatelitů byl nejprve založený na restrikční analýze a následnému použití sond, které hybridizovaly s lokusy minisatelitů. Tato technika byla později zjednodušena na použití PCR amplifikátů,

čímž jí byla přidána i citlivost. Na druhou je stranu analýza různorodosti délky PCR amplifikátů nevýhodná pro přílišnou délku většiny minisatelitů, u kterých nelze účinně provést amplifikaci. JEFFREYS et al. (1991) zavedli nový PCR systém, MVR (z angl. Minisatellite Variant Repeat, odlišné minisatelitní repetice) který vyřešil tyto problémy a umožnil analýzu vnitřních a často skrytých variací repetice. Tato metoda je založena na použití primerů, které jsou navrženy specificky pro varianty repetice a umožňuje postupnou PCR analýzu dlouhých opakujících se oblastí s občasnými variacemi. Vnitřní variace jsou přítomny u většiny minisatelitů.

Mutační frekvence minisatelitů pravděpodobně nezávisí na jejich délce, jako je tomu například u mikrosatelitů (viz 2.2.4.2). Krátké repetitivní oblasti mohou být stabilní miliony let, zatímco dlouhé alely mohou mít extrémní frekvenci mutačních změn (až 15%). Zdá se, že vysoká nestabilita lidských minisatelitů je zapříčiněna vlastnostmi samotné repetitivní sekvence. Důkazem této teorie může být pokus, ve kterém si nestabilní lidský minisatelit MS1 zachoval svojí nestabilitu i po vložení do genomu *Sacharomyces* (CEDERBERG et al., 1993).

Mutační změny minisatelitů nejsou rozmístěny náhodně, ale probíhají převážně na jednom konci lokusu. Výskyt takových polárních „hot spots“ (angl. horkých míst mutací) byla potvrzena analýzou mutací u germinálních linií (ARMOUR et al, 1993).

3.2.2.4.2. Mikrosatelity

Mikrosatelity, jinak zvané rovněž SSR (z angl. simple sequence repeats), jsou jednoduché tandemové repetice dinukleotidivých až tetranukleotidových sekvenčních motivů, které jsou obklopeny unikátními sekvencemi.

Existence SSR byla nejprve prokázána na lidském genomu, postupně byly SSR sekvence nalezeny i u dalších druhů- savců, ptáků, ryb, hmyzu, kvasinek i u několika druhů rostlin.

Jednou z nejdůležitějších vlastností mikrosatelitů je vysoké zastoupení alelické diverzity. Díky tomu jsou použitelné jako genetické markery. Unikátní sekvence hraničící s SSR motivy poskytuje specifické šablony pro PCR reakci.

Přestože jsou mezi minisatelity a mikrosatelity principální rozdíly, hranice mezi nimi je stanovena délkou opakující se jednotky. Repetitivní jednotka mikrosatelitů je dlouhá 1-6 bp, mikrosatelitní 10-100 bp. Z evolučního pohledu se dá říci, že minisatelity mohou vznikat z mikrosatelitů.

Pro vazebné mapování jsou nejvhodnější delší tandemové repetice (více než 200 bp). ARMOUR et al. (1994) vyvinuli systém pro izolaci krátkých repetic. Ten je založen na obohacení tandemových repetitivních DNA fragmentů jejich hybridizací do jiných dlouhých oblastí s tandemovými repetitivními. Z amplifikovaných fragmentů o délce 400- 1000 bp jsou fragmenty obsahující tandemové repetice selektovány hybridizací na dlouhé sondy s různými trimerickými či tetramerickými repetitivními sekvencemi. K hybridizační selekci jsou používány jak přírodní, tak syntetické sekvence. Toto obohacení umožňuje rychlou izolaci velkého počtu mikrosatelitních klonů.

Mnoho mikrosatelitů je mutačně nestabilních, v některých případech dokonce extrémně. Obecně jsou repetitivní sekvece bohaté na CG trinukleotidy a CA dinukleotidy nestabilní více, než jiné. Důvod pro tuto specifickou nestabilitu je neznámý. V extrémních případech může mít každá buňka v organismu jinou délku mikrosatelitu (KUHL et al., 1993). Nestabilita je velmi ovlivněna délkou mikrosatelitu- čím je mikrosatelit delší, tím je nestabilnější.

Většina běžných délkových mutací zahrnuje pouze poměrně malé změny. Hlavní příčinou délkových mutací je prokluzování řetězce DNA během jeho replikace (SCHÖTTERER a TAUTZ, 1992). Navíc existuje souvislost mezi prokluzováním a opravnými mechanismy, což ještě zvyšuje nestabilitu DNA.

3.2.2.5. SNP: Single-nucleotid polymorphism

Mezi nejběžnější typ polymorfií patří jednonukleotidové záměny (SNP), které se vyskytují ve frekvenci přibližně 1 záměna na 1000 bází. Jsou vysoce rozšířené, stabilní a distribuované v celém genomu. Tyto varianty jsou spojené s diverzitou v populaci, individualitou, vnímavostí k nemocím a individuální odpovědí k léčivům. Tyto jednoduché změny v DNA sekvenci, z nichž se většina nachází mezi geny (intergenetic spacer, angl mezigenový rozdělovač), jsou pravděpodobně stabilní a nejsou pro organismus zhoubné. SNP, které nemění aminokyseliny, jsou nazývány synonymní a nejsou předmětem přírodní selekce (KIMURA a TAKAHATA, 1983).

Pro mapování SNP může být použito velké množství metod- konformační polymorfismus jednovlákného řetězce (ORITA et al., 1989), heteroduplexní analýza (LICHTEN a FOX, 1983), elektroforéza na denaturačním gelovém gradientu (DGGE), enzymatická mutační detekce (YOUIL et al., 1995). Jako nejvýhodnější metoda pro hledání SNP se ovšem ukázalo DNA sekvenování.

Mapování SNP vyžaduje obrovské množství času a zdrojů. Musí být otestovány stovky jedinců kvůli vyloučení falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Navíc většina metod detekuje pouze 80% mutací. Z tohoto důvodu je nutné nalézt jinou, vhodnější metodu pro SNP mapování.

SNP jsou hledány především v lidském genomu, kde se předpokládá jejich možné využití pro určení náchylnosti jedince k nemocem či individuální odpovědi jedince na léčbu.

3.2.2.6. Intronové polymorfismy

Tento typ genetických markerů v sobě zahrnuje výhody všech výše uvedených skupin. Kvůli velmi častým mutacím poskytují introny dostatečné množství polymorfizmů nutných pro tvorbu vazebných map. Intronové sekvence často nesou repetitivní sekvence nebo zbytky mobilních elementů (například transpozómů). Sekvence primerů pro PCR je navržena z hraničních exonových

oblastí, což zajišťuje unikátost amplifikátů a rovněž umožňuje fyzické mapování genu, ve kterém se intron nachází. Délkové polymorfizmy intronů je možné analyzovat na agarózovém gelu. Pro větší citlivost techniky je vhodné zařadit štěpení restriční endonukleázou a porovnávat restriční fragmenty (MÁCHA et al., 2003).

3.2.2.7. RH panel- radiační panel

Radiační hybridy jsou buňky, které kromě svého genetického materiálu obsahují i genetický materiál odlišného živočišného druhu. Jsou produkovány fúzí ozářených donorových buněk s buňkami jiného živočišného druhu, nejčastěji hlodavčími. Fúzi lze indukovat buď chemicky, působením polyetylglykolu, nebo biologicky, vystavením buněk působení Sendai viru (McCARTHY, 1996).

Mapované chromozomy jsou po ozáření buňky radioaktivními paprsky rozlámány na velký počet fragmentů. Velikost fragmentů chromozomů je závislá na dávce radioaktivního záření. Je možné konstruovat panely s několika markery i s velkým počtem různých markerů. Fragmenty jsou při fúzi náhodně zainkorporovány do akceptorových buněk. Každá z výsledných buněčných linií si udrží část z genomu donorových buněk. Markery které leží blíže u sebe v genomu jsou velmi často udrženy tou samou buněčnou linií. U výsledných hybridů je analyzována přítomnost, případně nepřítomnost testovaných DNA markerů, a dále frekvence, s jakou se jednotlivé markery objevují v jedné buněčné linii. Čím blíže se markery nacházejí v donorovém genomu, tím je vyšší pravděpodobnost jejich současného výskytu v jedné hybridní linii.

Selekce hybridních buněk obvykle probíhá kultivací s HAT (Hypoxantin-Aminopterin-Tymidin) médiem. Jedna linie buněk je HGPRT (hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferáza) deficientní a druhá linie je TK (tymidin-kináza) deficientní. Aminopterin v médiu blokuje *de novo* syntézu purinů a pyrimidinů. Pokud jsou ale v buňce funkční oba zmíněné enzymy, puriny a pyrimidiny mohou být syntetizovány alternativní dráhou za využití hypoxantinu a tymidinu (MCCARTHY,

1996). Takto jsou pozitivně selektovány pouze úspěšně fúzované buňky, které ve svých chromozómech nesou vloženou sadu náhodných DNA fragmentů mapovaného druhu. Sada těchto buněk pokrývající celý genom se nazývá panel radiačních hybridů (MCCARTHY, 1996).

Rh panely mohou sloužit ke konstrukcím vazebných genetických map. Rekombinantní mapy jsou limitovány polymorfními markery a úrovní rekombinace, nicméně radiační hybridní metoda využívá rozdílů mezi živočišnými druhy a může být použita jak pro polymorfní, tak pro nepolymorfní markery.

Další výhodou této metody je možnost mapování markerů v blízkosti centromery, které jsou jinými metodami velmi obtížně zmapovatelné vzhledem k nízké úrovni rekombinace.

3.2.3. Vazebná mapa *X. tropicalis*

V současné době je osekvenován celý genom druhu *X. tropicalis* do jednotlivých scaffoldů. Scaffold je série zmapovaných oblastí DNA, které jsou seřazeny ve správném pořadí. Jednotlivé scaffoldy ale nemusí být nutně spojeny do souvislého řetězce. Vazebné mapování umožňuje jejich zařazení a seřazení do vazebných skupin.

Pro získání velkého množství polymorfních markerů je výhodné použít pro křížení dva nepříbuzné kmeny. Laboratoř R. M. Graingera ve Virginii, USA, disponuje dvěma imbredními liniemi *X. tropicalis*. Kromě těchto kmenů jsou dostupné také divoké populace *X. tropicalis* neznámého původu, označených A-F, rovněž v chovu R.M.Graingera.

3.2.3.1. Vazebná mapa vytvořená pomocí SSR markerů

Na základě spolupráce University of Houston a Baylor College of Medicine vzniká vazebná mapa vytvořená pomocí SSR markerů. Tato mapa je dostupná na internetových stránkách <http://tropmap.biology.uh.edu/>. Genetická vazebná mapa byla vytvořena programem JoinMap 3.0 (VAN OS *et al.*, 2006). Program

analyzoval data z 1713 polymorfních markerů a 1558 z nich zařadil do 10 velkých vazebných skupin. Zbylých 74 markerů nebylo možné do žádné z těchto vazebných skupin zařadit a byly umístěny do 6 malých vazebných clusterů s označením A-F. Každý z nich obsahuje 12 markerů. Vazebná mapa je v současné době neustále doplňována.

3.2.3.1.1. Strategie mapování

V prvním kroku je identifikována unikátní SSR sekvence v genomu *X. tropicalis* (<http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html>). Z této sekvence jsou navrženy primery pro PCR reakci (<http://frodo.wi.mit.edu/>) amplifikující tyto sekvence. Následně je provedeno křížení dvou jedinců ze dvou inbredních linií Nigerian a Ivory Coast. Jejich potomci jsou testováni na polymorfii markeru. 2-3 vhodné páry, které jsou v markeru polymorfní, jsou kříženy a zakládají druhou filiální generaci, která by měla mít alespoň 500 jedinců. Pro polymorfní markery jsou nasyntetizovány fluorescentní primery. Ty jsou následně použity pro multiplexní PCR reakci a kapilární analýzu amplifikovaných fragmentů u F2 generace. Získaná data jsou zpracována programem MAPMAKER (LANDER et al., 1987).

Posledním krokem je potvrzení vytvořené vazebné mapy fyzickým mapováním jednotlivých vazebných skupin a clusterů do přílušných chromozómů *X. tropicalis* metodou FISH.

Všechny nalezené markery v databázi jsou klasifikovány typem tandemové repetice jako di-, tri-, tetra-, či mixované. Všechny z di-, tri-, a tetra- nukleotidových repetice obsahují jednu či více nepřerušovaných tandemových repetice, ve kterých má každý tandem nejméně pět di-, tri- či tetra- nukleotidových repetičních jednotek. Repetice označené jako mixované obsahují dvě nebo více tandemových repetičních jednotek různých typů. Jiné markery, které nejsou zařazeny do výše uvedených skupin, jsou označovány jako „ostatní“ (velké repetice o 6-20 nukleotidech, repetice jednonukleotidové, rozlámané, nedokonalé a nespecifikované).

V laboratoři vývojové biologie PřFUK podařilo na základě fyzického mapování cDNA markerů přiřadit všech 10 vazebných skupin k jednotlivým chromozómům *X. tropicalis* (V. Krylov, data připravená do publikace) (viz. Tab. 1).

LG 1	LG 2	LG 3	LG 4	LG 5	LG 6	LG 7	LG 8	LG 9	LG 10
Chr.1	Chr.8	Chr.6	Chr.5	Chr.10	Chr.2	Chr.3	Chr.9	Chr.4	Chr.7

Tabulka 1: Přiřazení jednotlivých vazebných skupin (LG 1 – LG 10) k chromozómům *X. tropicalis*.

3.2.3.2. Vazebná mapa získaná pomocí AFLP markerů

KOCHAN et al.(2002), vytvořili vazebnou mapu *X.tropicalis* s použitím 51 AFLP markerů a 2 isozymních markerů. Pro získání velkého množství polymorfíí v markerech použili pro křížení divoký kmen, protože očekávali vysoký výskyt polymorfíí v genomu.

3.2.3.2.1. Strategie mapování

U kmene A bylo použitím šesti kombinací primerů identifikováno osmdesát různých AFLP markerů. Dále byli jedinci heterozygotní pro tři lokusy isozymů pro isocytrát dehydrogenázu 1 (IDH 1) a malic enzyme 1 a 2 (ME1 a ME2). Tyto lokusy tvořily tkzv. „kotevní sekvenci“. Devět AFLP markerů neseɡregovalo při zpětném křížení v poměru 1:1 (homozygot:heterozygot), a proto byly ze studie vyloučeny. Ty markery, které vykazovaly vazbu s ME2 byly zařazeny do vazebné skupiny LG1 (linkage group), markery ve vazbě s IDH1 vytvořily vazebnou skupinu LGII. Ostatní markery byly přiřazeny do vazebných skupin U1-U17 (z angl. unachored), které netvořily vazbu se žádnou „kotevní“ sekvencí.

U kmene Nigerian bylo získáno patnáct polymorfních AFLP, jeden neselegoval při zpětném křížení v poměru 1:1 a byl ze studie vyloučen. 9 AFLP markerů vytvořilo tři vazebné skupiny U18-U20.

3.2.4. Konstrukce vazebných map

Vazebná vzdálenost dvou markerů je daná poměrem počtu rekombinantů k celkovému množství potomků. Teoreticky dosahuje tento zlomek hodnot 0-0,5. Minimum znamená, že mezi dvěma lokusy k rekombinaci nedochází- jsou v úplné vazbě. Maximum (0,5) pak znamená jejich nezávislost. Takové geny se nacházejí buď na různých chromozomech, nebo na stejném, ovšem velmi daleko od sebe.

3.2.4.1. Analýzy dat

Pro analýzu dat získaných při křížení se používají počítačové programy. Programy jsou většinou volně dostupné a šířené- například na stránkách <http://linkage.rockefeller.edu/soft/>. Nutnost použití počítačových programů plyne především z velkého množství dat získaných z vazebných studií.

3.2.4.1.1. LOD Score

Jako statistický test používaný v lidských, rostlinných i zvířecích populacích se využívá LOD score (logarithm of the likelihood ratio). Tato statistická metoda je základem velkého množství počítačových programů. Původně byla zavedena statistika LOD pro sledování genetické vazby u člověka (HALDANE a WADDINGTON, 1931). MORTON (1955) tuto techniku pozměnil na výpočet LOD skóre.

Pro stanovení vazby je velice důležité rozlišit mezi náhodnými fluktuacemi počtu potomků v každé skupině potomků a skutečnou vazbou. LOD skóre je založeno na přímém porovnání pravděpodobnosti nulové hypotézy, která praví, že vazba neexistuje (rekombinační zlomek 1/2), s alternativní hypotézou, která tvrdí, že existuje vazba s určitým rekombinačním zlomkem $\theta < 1/2$. Pro jednoduchost se

většinou používá logaritmus se základem 10 (logarithm of the odds ratio = LOD score).

LOD score je metoda používaná například pro nemoci s Mendelovskou dědičností. Výstupem programů je nejčastěji „křivka LOD score“, jejíž maximální hodnota udává očekávanou pozici lokusu genu na chromozomu. Programy využívající tuto statistickou metodu jsou například dnes již klasické MENDEL, MapMaker nebo LINKAGE. Ten byl nahrazen novějším programem FASTLINK.

3.2.4.1.2. Vazebná nerovnováha

Vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium) je nenáhodné spojení dvou nebo více alel či lokusů, které se nemusí nacházet na stejném chromozomu. Nejde o stejný princip jako u vazby. Ta popisuje asociaci dvou či více markerů na chromozomu, mezi kterými může probíhat rekombinace. Vazebná nerovnováha popisuje situaci, kdy se některé kombinace genetických markerů vyskytují v populaci s vyšší či nižší frekvencí, než se očekává. Nerovnoměrná asociace mezi geny je měřena úrovní vazebné nerovnováhy (LD, z angl. linkage disequilibrium).

Pro měření úrovně LD existuje široká škála statistických metod. V závislosti na kontextu je jejich použití rozdílně výhodné. První metoda navržená pro výpočet LD (symbolizovaná D) ji kvantifikuje jako rozdíl mezi zjištěnou frekvencí dvou haplotypů a její očekávanou frekvencí při rovnoměrném rozdělení alel (LEWONTIN, 1964). V současné době jsou nejběžnější metody pro výpočet LD absolutní hodnota D' a r^2 . Absolutní hodnota D' je dána podílem D a maximální možnou hodnotou D danou frekvencí alel na dvou lokusech. V případě, že je $D=1$, je mezi dvěma lokusy úplná LD. $D' < 1$ svědčí o disrupci předcházející úplné LD. D' je silně ovlivněna především u malých populací. Druhá statistická metoda, r^2 je svým způsobem komplementární k D' . Vypočítá se jako podíl D^2 a výsledná frekvence zastoupených alel na dvou lokusech.

Vazebná nerovnováha je obecně způsobena genetickou vazbou a úrovní rekombinace, mutací, driftem, nerovnoměrným křížením a strukturou populace.

Nepohlavně se rozmnožující organizmy vykazují vyšší úroveň vazebné nerovnováhy právě pro své asexuální rozmnožování a tudíž i nulovou rekombinaci. U rychle rostoucí populace se vlivem genetického driftu úroveň LD snižuje.

Pro měření LD se používají různé počítačové programy, například Haploview, LdCompare (volně k stažení na internetu na <http://www.nslj-genetics.org/soft>) PyPop, Helix Tree a další.

3.2.2. FYZICKÉ MAPOVÁNÍ GENOMU

3.2.2.1. Vztah vazebné a fyzické mapy

Pořadí lokusů určené pomocí vazby by mělo být vždy stejné jako pořadí těchto lokusů v DNA sekvenci podél chromozomu. Kdykoli tedy nesouhlasí pořadí v sekvenci s genetickou mapou, musí být chyba v genetické mapě, v sekvenci nebo v obou. Protože sestavování fyzické a vazebné mapy jsou na sobě většinou nezávislé, může být vazebná mapa využita k hledání a opravě chyb v mapě fyzické a naopak.

Vztah mezi vazebnými vzdálenostmi v cM a DNA sekvencí je na druhou stranu složitý. Celogenomové porovnání genetické mapy z deCODE a veřejné sekvence lidského genomu vede k průměrnému odhadu 1,13 cM/Mb. Na druhou stranu je rozpětí hodnot větší než jeden řád. Současný model předpokládá střídání horkých míst pro rekombinace a rekombinantních "pouští" podél chromozomu (JEFFREYS *et al.*, 1985). Lze jmenovat určitá obecná pravidla: Typické rekombinantní pouště (tedy místa kde dochází k nejméně crossing-overům) jsou centromery a frekvence rekombinací stoupá směrem k telomerám.

Rovněž problematické jsou pohlavní chromozómy. U ryby medaka byla zjištěna jejich rozdílná délka vazebné mapy u samic a samců, která plynula z odlišné frekvence rekombinace. Na druhou stranu nebyl zjištěn žádný morfologický rozdíl mezi pohlavními chromozomy a i pořadí genů ležících na nich je shodné (KONDO *et al.*, 2001).

Vazebné mapování může ovlivnit i rozložení použitých markerů v genomu studovaného druhu. Například porovnáním vazebné a fyzické mapy u druhu *Xenopus tropicalis* se ukazuje, že SSR markery používané při vazebném mapování nejsou v genomu rozděleny rovnoměrně a některé oblasti pravděpodobně vůbec nejsou vazebně mapovány.

3.2.2.2. ISH

Zavedení in situ hybridizace (GALL a PARDUE, 1969) znamenalo přesun z období klasické cytogenetiky do období molekulárně cytogenetického výzkumu. Hlavním principem metody je hybridizace označeného vlákna DNA, kterému se říká sonda, s komplementární sekvencí DNA nebo RNA. Metoda byla původně založená na principu radiačně značených sond. V současné době se používají chromogenické značky spojené s enzymem či koloidní zlato.

Na rozdíl od klasické hybridizace, při které sonda nasedá na izolovanou molekulou DNA či RNA, v in situ hybridizaci se cílová DNA či RNA nachází v buňkách či tkáních. Podmínkou hybridizace sondy je jednovlákná struktura DNA. Denaturace DNA v chromozómu je dosaženo ošetřením preparátu roztokem formamidu, který snižuje teplotu tání DNA. Tento postup umožňuje zachovat morfologii chromozómu, která by jinak byla poškozena příliš vysokou teplotou nutnou k denaturaci DNA dvojšroubovice.

Značnou nevýhodou techniky byla především cena radioaktivně značených sond a nebezpečí ozáření při manipulaci s nimi. Další nevýhody plynou ze samotných vlastností radioizotopů. Jsou nestabilní a úroveň jejich záření v čase klesá. Specifická aktivita sondy tedy není konstantní v čase. Senzitivita sondy je sice velká, ale výsledky jsou její nestabilitou značně limitovány. K změření signálu je rovněž zapotřebí poměrně dlouhá expozice, což vede ke snížení intenzity záření sondy.

V současné době se ISH používá spíše pro vizualizaci mRNA v buňkách, než pro fyzické mapování na chromozomech.

3.2.2.3. FISH

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) umožňuje přímé mapování DNA sekvence na chromozomu. V posledních letech se stala nejdůležitější technikou v molekulárně cytogenetickém výzkumu. Na rozdíl od metody ISH využívá sondy používající fluorescenčně značené nukleotidy. Jako jedinečná předloha pro hybridizaci sondy může sloužit jak unikátní, tak repetitivní DNA sekvence na chromozomu.

Limitní rozlišení metodou FISH je v interfázním jádře zhruba 100 Kbp, v mitotických či meiotických profázních chromozómech několik megabází vzdálených sekvencí (JIANG a GILL, 2006). Poskytuje tak vysoce specifické mapování s poměrně velkým rozlišením. Proto je vhodným doplňkem k sekvenování genomu a vazebnému mapování.

3.2.2.3.1. Typy FISH sond

FISH sondy lze funkčně rozdělit na místně specifické sondy, sondy značící celý chromozóm a sondy značící centromery nebo telomery.

Sondy mohou být různě dlouhé, od 20-40 bp po stovky kbp. Záleží především na cílové sekvenci, její znalosti a očekávané specifičnosti reakce. Důležitou roli hraje i síla vazby mezi sondou a cílovou sekvencí. Tu může ovlivnit koncentrace formamidu, solí, hybridizační teplota nebo pH.

Podle vlastností lze sondy rozdělit na několik typů: oligonukleotidové sondy, jednovlákné DNA sondy, dvouvlákné DNA sondy a RNA sondy.

Oligonukleotidové sondy jsou připravovány chemickou syntézou z deoxyribonukleotidů. Jsou velké asi 40-50 bází, což je výhodné pro in situ hybridizaci, protože takto malé sondy se snadno dostávají do buněk. Nevýhodou tohoto typu sond je, že je nutné znát přesnou sekvenci cílové DNA.

Jednovlákné DNA sondy jsou velké asi 200-500 bazí. Mohou být připraveny buď reversní transkripcí mRNA nebo PCR amplifikací s použitím jednoho primeru. Nevýhodou této techniky je vyšší cena, delší doba a náročnost přípravy sondy.

Dvouvláknové DNA sondy jsou připravovány vložением sekvence do vektoru, který je inkorporován do bakterií a kde dochází k amplifikaci. Vektor je z bakterií izolován a cílová sekvence vyštěpena restričními enzymy. Protože je sonda dvouvlákná, je před hybridizací nutná její denaturace.

RNA sondy jsou používány výhradně pro lokalizaci mRNA v cytoplazmě. Jejich výhodou je především síla vazby dvouvlákné RNA.

Jako sondy pro FISH analýzu mohou sloužit kosmidové, BAC (z angl. Bacterial Artificial Chromosome), YAC (z angl. Yeast Artificial Chromosome) nebo PAC (z angl. P1-derived Artificial Chromosome) klony. Ty bývají dlouhé několik desítek až stovek kbp. Velké sondy často obsahují repetitivní sekvence, které zvyšují pravděpodobnost nespecifického signálu. Tento problém lze řešit inkubací sondy s neznačenou kompetitorovou DNA studovaného organismu, případně s frakcí DNA obohacenou o repetitivní sekvence (LANGEDENT et al., 1987).

3.2.2.3.2. Způsoby značení FISH sond

Přestože může být FISH sonda menší než 1 kbp, je obtížné její signál rozeznat od pozadí. V takovém případě je nutná nepřímá vizualizace. Značený nukleotid slouží jako hapten pro reakci s příslušnou protilátkou spojenou s fluoroforem. Nejčastěji používanými hapteny jsou biotin, digoxigenin, nebo fluorescenční sloučeniny. Při použití velmi krátkých sond (pod 1 kb) nejsou tyto metody pro identifikaci signálu dostatečné. V takovém případě je nezbytná buď amplifikace signálu nebo amplifikace cílové sekvence.

3.2.2.4. Amplifikace signálu

3.2.2.4.1. CARD (Catalyzed Reporter deposition)

Metoda CARD zvyšuje senzitivitu ISH i FISH 100-1000 krát (SPEEL et al., 1999). Tím umožňuje detekci jak repetitivních a unikátních sekvencí o velikosti 1-5 kB, ale též až tří kopií různých DNA sekvencí zároveň (SPEEL et al., 1997), nízkopiových i jednokopiových virů a dalších mikroorganismů v buňce a různých rRNA a mRNA.

Původně byla metoda určena pro amplifikaci signálu při imunoblotingu a ELISA testech (BOBROW et al., 1989). Její princip je založen na depozici velkého množství haptenizovaných tyramidových molekul peroxidázovou aktivitou.

Základ systému tvoří tyramid a enzym křenová peroxidáza (z angl. „horseradish“, HRP). Je-li tyramid aktivován pomocí HRP, přemění se na volný radikál a kovalentně se váže na struktury bohaté na elektrony jakými jsou např. tyrosinové zbytky v proteinech. V praxi se používají specifické protilátky a protilátky s navázanými HRP, které aktivují molekuly tyramidu. Další variantou je komplex specifické biotinylované sondy s konjugátem streptavidin-HRP. Tyramid-fluorofor je tak opět aktivován v příslušném místě.

Pokud je tyramid přítomen ve vysokých koncentracích, může křenová peroxidáza katalyzovat jeho dimerizaci (ZAITSU a OHKURA, 1980). Nízké koncentrace tyramidu omezují pravděpodobnost dimerizace. Vzniklé vysoce reaktivní meziprodukty se opět ochotně vážou k okolním molekulám bohatým na elektrony.

Velkou výhodou metody CARD je, že k amplifikaci signálu dochází až po hybridizaci sondy a promývání preparátu. Tento postup zajišťuje specifitu hybridizace sondy a dále není potřeba měnit podmínky klasické hybridizace. Na druhou stranu je třeba počítat s faktem, že dochází k amplifikaci jak specifického, tak nespecifického signálu.

3.2.2.4.2. In Situ PCR

In situ PCR umožňuje histologickou lokalizaci nízkokopiové DNA či RNA sekvence. Tato cílená amplifikace kombinuje techniky PCR a ISH. In situ PCR je nejčastěji aplikována na tkáních fixovaných ve formalinu a pro tyto podmínky je technika nejlépe optimalizovaná. Z pohledu lokalizačních experimentů se in situ PCR ukázala být vhodná pro detekci repetitivních telomerických sekvencí stejně jako jedinečných sekvencí (HARRER et al., 2001).

Prvním krokem metody je fixace vzorku a jeho předběžné zpracování umožňující vstup dvou proti sobě orientovaných primerů, nukleotidů a polymeráz do buněk. Zároveň by nemělo docházet ke ztrátám již vytvořených amplifikátů a snížení PCR amplifikace v buňce. Možné degradaci buněčné DNA lze zabránit přidáním RNasy ke vzorku. Přímo v buňce katalyzuje termostabilní DNA polymeráza amplifikaci specifické genové sekvence na detekovatelnou úroveň. Na druhou stranu některé práce (SIBONY et al. 1995; SPERRY et al. 1996, SPEEL et al. 1999) tento princip zpochybňují, protože stejných výsledků bylo dosaženo i pouhým opakovaným zahříváním vzorku bez přítomnosti termostabilní DNA polymerázy.

Značnou nevýhodou techniky je nízká účinnost amplifikace, špatná senzitivita a problémy při kvantifikování výsledků (KOMMINOTH a LONG, 1993). Tyto problémy mají několik příčin. Hlavní je šíření a denaturace PCR produktů v buňce, kterým nelze zabránit. Výsledky in situ PCR mohou být značně ovlivněny i inkorporací značených nukleotidů do nespecifických produktů. Pro správnou interpretaci výsledků se jako doplněk metody používá několik různých kontrol.

Modifikací in situ PCR lze na základě reverzní transkripce ve vzorku detekovat také molekuly mRNA. Metoda je označována jako in situ RT PCR (NUOVO et al., 1992) a využívá vlastností rekombinantní rTth DNA polymerázy.

Pro in situ PCR a in situ RT PCR se nejčastěji používají nukleotidy značené digoxigeninem a biotinem. Výhoda digoxigeninu tkví především v tom, že se nenachází v savcích buňkách a tudíž nehrozí vznik signálu na pozadí. Další možností je využít značené primery. Tím dochází k úplné eliminaci signálu

pocházející z nespecifické amplifikace. Na druhou stranu je signál pocházející ze značených primerů velmi slabý (NUOVO et al., 1997). Poslední možnosti jsou radioaktivně značené nukleotidy, které se v dnešní době příliš nevyužívají.

3.2.2.4.3. PRINS (Primes In Situ)

Tato metoda je velmi podobná In Situ PCR, ale používá se při ní pouze jeden primer (KOCH et al., 1989). Nejčastější využití je v rámci amplifikace repetitivních sekvencí, jako například tandemově uspořádané repetice telomer (TTAGGG)_n.

Technikou PRINS je možné rozlišit některé lidské chromozómy (KOCH et al., 1989), a to na základě amplifikace α -satelitní DNA. Její základní jednotkou je 171 bp dlouhá sekvence nacházející se v centromerických oblastech chromozómů všech primátů. Dále je možné použít PRINS pro značení celých lidských chromozómů (GOSDEN et al., 1991). Jako místa pro nasednutí primerů slouží Alu repetice, které se nacházejí nerovnoměrně v genomu v přibližně 300 až 900 tisících kopiích.

I přes určitá omezení je tato technika využívána především pro velmi specifické značení, snadnost a možnost kombinovat ji s metodou FISH a imunoflouescencí. Přestože je používána především pro značení repetitivních sekvencí, CINTI et al. (1993) použili metodu i pro lokalizaci genu pro srážecí faktoru IX a KADANDALE et al. (2000) s její pomocí lokalizovali lokus pro sry a sox3 geny na lidských chromozómech X a Y.

.

3.2.2.5. Fyzické mapování nevyužívající FISH techniky

Do dnešní doby není možné ve všech případech zcela přesné určit polohu sondy. Z toho důvodu je nutné používat klony obsahující přesahující oblasti cílové sekvence. Takovým klonům se říká kontigy. Kontigy pokrývající celý genom tvoří genomovou knihovnu. Tu lze získat zaklonováním částí cílového genomu do bakterií. Vybudování takové genomové knihovny je prvním krokem fyzického mapování.

3.2.2.5.1. Fyzické mapování pomocí restričních enzymů

Restriční mapování umožňuje molekulární mapování s výsledky závislými na frekvenci výskytu restričních míst. Při nejjednodušším použití metody je fragment DNA štěpen dvěma restriktázami- jednou zvlášť, jednou oběma zároveň. Restrikcí vznikají různě dlouhé fragmenty. Malé restriční fragmenty jsou rozděleny podle velikosti na agarózovém gelu, větší pomocí pulzní elektroforézy. Restriční mapa vzniká porovnáním a seřazením fragmentů.

3.3. URČENÍ POHLAVÍ

U zvířat je pohlaví určeno geneticky nebo enviromentálními faktory, jako například teplotou nebo výskytem dominantního jedince. U geneticky určeného pohlaví obratlovcích druhů určují heterogametické pohlavní chromozómy buď vývoj v samce ($XY\text{♂}$ - typ Drozofila) nebo samici ($ZW\text{♀}$ - typ Abraxas). U pohlaví typu XX/XY byly geny určující vývoj v samce identifikovány. U většiny savců se jedná o gen SRY, který se nachází na Y chromozómu. U kostnatých ryb (medaka) je určujícím genem DMY/Dmrt1bY. Molekulární mechanismus určení pohlaví je u systému ZZ/ZW neznámý.

3.3.1. Vznik systémů určení pohlaví

Jedna z hypotéz o původu typu pohlaví XX/XY u savců tvrdí, že vznikl de novo u jednoho z předků s určením pohlaví závislým na teplotě translokací genu určujícího pohlaví z autozomu na vznikající pohlavní chromozóm. Tuto teorii podporuje i nalezení bloků genů lidského chromozomu X na autosomech mořské želvy s teplotně určeným pohlavím (GRAVES a SHETTY, 2001). Další podpora vychází z nedávno zkonstruované genetické mapy ptykopska. Tento savec má systém určení pohlaví $5X/5Y$. Při meióze tvoří chromosomy řetězec, na jehož jednom konci se nachází X chromozóm nesoucí typické savčí geny, zatímco na druhém se nachází X chromosom nesoucí kandidátní gen určení pohlaví u ptáků DMRT1. Z toho lze usuzovat, že savčí typ určení pohlaví (XY) mohl vzniknout

z ptačího typu (ZW) translokací části Z chromosomu na autosom u ZZ zvířete (samec) (GRÜTZNER, et al., 2006). Na druhou stranu mají lidský chromosom X s kuřecím Z chromosomem tak málo orthologů, že mohly vzniknout i nezávisle na sobě z různých autosomů.

Pro zjištění skutečného vztahu předchůdců lidského X a kuřecího Z chromozómu bylo nutné provést porovnání s dalším živočišným taxonem. V tomto případě je nejvhodnější použít nejbližší žijící taxon amniot, tedy obojživelníky. SMITH a VOSS (2007) vytvořili genetickou mapu mloka ze které vyplývá, že se u něho nacházejí geny z lidského chromosomu X a kuřecího Z ve stejné vazebné skupině. To by mohlo potvrzovat teorii, že se oba systémy určení pohlaví vyvinuly ze stejného základu. Na druhou stranu zůstává otázka typu určení pohlaví u původních amniot i modifikací vedoucí k vytvoření savčího XY a ptačího ZW systému nevyřešena. Pro skutečné vyřešení problému původu XY a ZW systému jsou nutná další data od obojživelníků.

3.3.2.Vznik pohlavních chromozómů

Morfologicky a geneticky rozdílné pohlavní chromozómy se vyvinuly nezávisle na sobě u různých jak živočišných, tak rostlinných druhů (BULL, 1987; CHARLESWORTH, 1996). Pravděpodobnou příčinou vzniku odlišných pohlavních chromozómů byla zábrana rekombinace mezi nimi (NEI, 1969). Malá úroveň rekombinací mezi pohlavními chromozómy X a Y, případně Z a W, byla způsobena rozdílností genů určující pohlaví. Mezi nimi nemohl probíhat crossing-over, což posléze vedlo k velkému odlišení pohlavních chromozómů. Nerekombinující chromozómy Y a W ztratily velké množství genů, které se nacházejí na chromozómech X a Z. Tyto chromozómy zůstaly se svými předchůdci homologní (CHARLESWORTH B., 2002; CHARLESWORTH D., 2002). Pokles rekombinace je nezbytnou podmínkou pro vznik dvou pohlavních chromozómů. Takto se snižuje možnost selekce výhodných mutací (ORR a KIM, 1998), ale zároveň znemožňuje fixaci negativních.

Mezi evolučně se vyvíjejícími chromozómy mohou ovlivnit rekombinaci dva typy změn. Jednou možností je postupné snížení úrovně rekombinace, které je zapříčiněno šířením genetických modifikací (BROOKS a Marks, 1988). Druhým typem jsou chromozómové přestavby, jako například inverze. Ta může ovlivnit rekombinaci u velké oblasti chromozómů, včetně genů, které nemají vliv na určení pohlaví. Inverze mohou být rovněž příčinou heteromorfizmu pohlavních chromozómů.

U savců má jen několik genů nacházejících se na X chromozómu homology na chromozómu Y. Na druhou stranu se na Y chromozómu nacházejí geny, které nemají homology na X. Tyto geny byly pravděpodobně na Y translokovány z autosomů (LAHN et al., 2001). Pohlavní chromozómy jsou většinou morfologicky odlišné (heteromorfní). Y nebo W mají velkou část heterochromatickou s velkým zastoupením repetitivní DNA (BULL, 1987). *Xenopus tropicalis* na druhou stranu heterochromatické chromozómy nemá. Lze u něj předpokládat podobu pohlavních chromozómů, jakou měli jiné živočišné druhy ještě před jejich odlišením.

Způsob vzniku a degradace chromozómu Y jsou zatím neznámé. Existuje několik teorií popisujících tento proces. Příčinou degradace vznikajícího chromozómu Y mohly být akumulace škodlivých mutací, snížení exprese genů na vznikajícím Y, selekce na pozadí, případně efekt pozitivních mutací. Není zatím známo, jestli geny na chromozómech Y a W ztrácely funkci postupně nebo v jednom kroku. U již vyvinutých pohlavních chromozómů probíhá degradace Y chromozómu pravděpodobně výrazně pomaleji, než u nových (neo)Y.

3.3.3. Geny vázané na pohlaví a pohlavím omezená exprese genů

U organismů s chromozomálním určením pohlavím se geny zodpovědné za iniciaci kaskády vývojových procesů nacházejí na pohlavním chromozómu. Když je tato kaskáda jednou zahájena, mohou další geny ovlivňující pohlavní vývoj ležet autosomech.

U XY systému určení pohlaví je chromozóm Y velmi často degenerovaný nebo dokonce může chybět. Proto je mnohem víc genů vázaných na X chromozóm než na Y (CHARLESWORTH a CHARLESWORTH, 2000). Platí to dokonce i pro geny určující samčí pohlaví (CHARLESWORTH et al., 1987).

Jeden z předpokládaných mechanismů ulehčující evoluci determinace pohlaví je vznik pohlavně specifických genových rodin na autozomech (VIA a LANDE, 1987). K tomu mohlo dojít vlivem alel s částečným účinkem na určení pohlaví, ale i evolucí zcela nových modifikovaných genů a regulačních drah (LANDE, 1980). Pohlavně specifická exprese genů a vazba genů na pohlaví jsou funkčně spojené, protože geny vázané na pohlaví se uplatňují při regulaci exprese genů autosomálních (CHARLESWORTH et al., 1987).

3.3.3.1. Geny s doménou DM

DM doména je na cystein bohatý DNA vazebný motiv. Geny s DM doménou byly nejprve nalezeny druhů *Drosophila melanogaster* (ERDMAN a BURTIS, 1993) a *Caenorhabditis elegans* (RAYMOND et al., 1998). U obou těchto druhů se tyto geny podílejí na určení pohlaví.

První protein s DM doménou nalezený u obratlovců, byl lidský Dmrt1 (RAYMOND et al., 1998). Tento gen se nachází na krátkém raménku na chromozomu 9 a delece této oblasti koreluje s chybným formováním varlat. Na druhou stranu nebyly doposud nalezeny žádné jednoznačné důkazy vlivu bodových mutací v Dmrt1 ovlivňující určení pohlaví u člověka (RAYMOND et al., 1999). Dmrt1 knock-out u myši vedl k normálnímu vývoji samic, u samců docházelo k chybnému vývoji varlat (RAYMOND et al., 2000). Nicméně raná diferenciací varlat probíhala normálně, z čehož plyne, že při ní nemá Dmrt1 u savců hlavní funkci.

Odpovídající geny byly nalezeny i u dalších druhů obratlovců. Podobně jako u savců byly exprimovány ve velmi raném stádiu diferenciací genitálního hrbolku (RAYMOND et al., 1999; SMITH et al., 1999; GUAN et al., 2000). Ve většině případů byla exprese vyšší u samců. U ptáků je homolog Dmrt 1 vázaný na pohlaví, nachází

se na Z chromozomu. Samci (ZZ) tedy mají větší množství tohoto genu v porovnání se samicemi (ZW). Další homolog byl nalezen u plazů s určením pohlaví závislým na teplotě- u aligátorů a želv (SMITH et al., 1999). U zástupců těchto skupin byla exprese *Dmrt1* vyšší u embryí, která se vyvíjela v samice. SHOEMAKER et al. (2007) prokázali, že má exprese *Dmrt1* v raných stádiích určení pohlaví dimorfní podobu.

Nejdůležitější studie určující vliv proteinů s DM-doménou byla provedena na rybě druhu Medaka. Ta má určení pohlaví typu XX/XY a byl u ní nalezen Y-specifický gen s DM doménou *DMY* (MATSUDA et al., 2002). Následně byly nalezeny dvě přirozené mutace v tomto genu a obě vedly ke zvratu pohlaví. Tato data nasvědčují tomu, že má *DMY* obdobnou funkci jako *SRY* u savců.

3.3.3.2. RBMX, RBMY

RBMX a *RBMY* jsou geny nacházející na lidských pohlavních chromozómech. Kódují RNA vazebné proteiny, které se podílejí na splicingu. Tyto geny se odděleně vyvinuly na chromozómech X a Y. *RBMY* je nutný pro vývoj varlat, zatímco *X* je nezbytný pro inaktivaci X chromozomu. V lidském genomu se nachází několik dalších genů podobných *RBMX*- na chromozómech 1, 4, 6, 9, 11, 20 a chromozomu X (LINGENFELTER et al., 2001). Sekvence *RBMX* je homologní u primátů a velkých opic se člověkem a nachází se u nich na souhlasné pozici.

Chromozóm Y ztratil při svém vzniku velké množství genů. Přesto se na něm nacházejí některé geny, které mají homology na chromozómu X. Takové geny mají často vliv na samčí vývoj (RICE, 1996). Několik nových genů bylo na chromozóm Y translokováno z autozómů (SAXENA et al., 1996). Většina Y vazebných genů však vznikla z genů původních, které se nacházely na obou pohlavních chromozómech. Na chromozómu Y získaly novou funkci, zatímco na X zůstala jejich funkce zachována. Společně s diferenciací nebo ztrátou genů na Y se jejich homology na X chromozómu většinou staly cílem pro inaktivaci. Právě to se v evoluci mohlo stát s geny *RBMX* a *RBMY*.

RBMX je gen pro RNA vazebný motiv, který se nachází na lidském chromozómu Y. Jeho homolog na chromozómu X se nazývá RBMY (DELLBRIDGE et al., 1999). Mazeyrat et al. (1999) našli homolog myšského genu RBMY na chromozómu X. To naznačuje, že genová rodina RBMY/RBMX, stejně jako jiné geny nacházející se jak na Y, tak na X chromozómu, pocházejí z homologů na pohlavních chromozómech.

RBMX je důležitý pro spermatogenesi, ale funkce genů této rodiny není příliš dobře známá. Lidská genová rodina RBMY obsahuje nejméně třicet členů na chromozómu Y, ovšem jen několik z nich je funkčních (MA et al., 1993; Elliot et al., 1997). RBMY geny kódují RNA vazebné proteiny s N-terminálním RNA vazebným motivem. C-terminální doména obsahuje dvě až čtyři domény s vysokým obsahem serinu, argininu, glycinu a tyrosinu (tzv. SRGY boxy). Ty jsou typické pro RNA sestřihové proteiny. Lidský RBMY je exprimován ve vyvíjejících se pohlavních buňkách v dospělých varlatech, ale i při vývoji buněk zárodečné linie (ELLIOT et al., 1997). Vzhledem k mužské neplodnosti při delecii dlouhého raménka chromozómu Y jsou RBMY kandidátními geny spermatogeneze (MA et al., 1993).

Gen RBMY je velmi podobný RBMY (DELLBRIDGE et al., 1999). Jeho produktem je rovněž protein s RNA vazebnou funkcí, který se podílí na sestřihu (Soulard et al., 1993).

U nesavců nebyl doposud zjištěn vliv homologů RBMY či RBMY na určení pohlaví ani vývoj pohlavních orgánů či zárodečných pohlavních buněk. U zebřičky (*Danio rerio*) je RBMY nezbytný pro vývoj mozku (TSEND-AYUSH et al., 2005), u druhu *Xenopus laevis* pro neurální a svalový vývoj (DICHMANN et al., 2008). Přesto RBMY i nadále zůstává kandidátním genem pro určení pohlaví u obojživelníků.

3.3.3.3. Sox geny

3.3.3.3.1. SRY

Gen SRY se nachází na savčím chromozómu Y. Jde o velmi malý gen, který nemá žádný intron. Obsahuje DNA vazebný HMG box (z angl. high mobility group protein). Je členem velké genové rodiny SOX genů (SRY- like HMG- box containing) (GUBBAY et al., 1990). SRY byl objeven analýzou krátkých fragmentů Y chromozómu, které translokovaly na chromozóm X v genomu XX samců a pravých hermafroditů. KOOPMAN et al. (1991) transgenezí u myši dokázali, že je SRY gen určující pro vývoj varlat . Podobná studie se stejným výsledkem byla provedena mutační analýzou u lidí (HAWKINS, 1993).

SRY ovlivňuje expresi dalších genů svým HMG boxem. Váže se jím na DNA a tím jí ohýbá (FERRARI et al., 1992). Produkty mutantního lidského SRY jsou deficientní jak při vazbě k DNA, tak při jejím ohybu (HARLEY et al., 1992). Přestože jsou produkty ostatních genů obsahujících HMG boxy transkripčními aktivátory, u SRY se v podmínkách in vitro tato funkce nepotvrdila (COHEN et al., 1994). Jeho skutečná role v in vivo podmínkách je stále neznámá. Předpokládá se, že se SRY váže na DNA, čímž ovlivňuje genovou expresi. Některé studie tvrdí, že SRY působí jako aktivátor (HAQQ et al, 1994), jiné, jako represor (MC ETREAVEY, 1993) a někteří autoři se domnívají, že má obě tyto funkce zároveň (HARLEY ET AL, 2003). Skutečnou funkci SRY bude nejprve nutné určit cíl jeho působení.

Exprese SRY koreluje s proliferací bipotencionálních podpůrných buněk. Z některých z nich se vyvíjí Seritoliho buňky (SCHMAHL et al., 2000). Dále má vliv na migraci buněk z mezonefros do samčích gonád (KARL et al., 1998). U myši i u lidí vede nástup exprese SRY mRNA k vývoji varlat. Na rozdíl od myši je u lidí SRY exprimován nejen v průběhu embryonálního vývoje, ale pokračuje až do dospělosti.

3.3.3.3.2. SOX 9

Kromě SRY je nezbytný pro určení pohlaví gen SOX 9, který rovněž obsahuje HMG box. Mutačními analýzami bylo zjištěno, že mutace v genu SOX 9

vedou ke zvratu pohlaví. Velké množství studií ukázalo, že je silným transkripčním faktorem (HARLEY et al, 2003). Aktivuje například transkripci kolagenu II. Jeho exprese vykazovala pohlavní dimorfismus u lidí, myši, kuřat, želv a aligátorů. U myši byla prokázána exprese SOX 9 pouze v Seritoliho buňkách, a to jak u vyvíjejících se, tak u dospělých varlat (MORAIS DA SILVA et al., 1996). Jeho exprese se v Seritoliho buňkách zvyšuje okamžitě po zahájení exprese SRY. To může znamenat, že SRY pozitivně ovlivňuje expresi SOX 9 (DE SANTA BARBARA et al., 2000). U myši SOX 9 pozitivně reguluje svojí vlastní expresi (KOOPMAN et al., 2001).

Ryby nemají gen SRY. Na druhou stranu je v jejich Seritoliho buňkách exprimován SOX 9 (TAKAMATSU et al., 1997; CHIANG et al, 2001). U živočichů s pohlavím závislým na teplotě je SOX 9 exprimován ve varlatech v teplotně senzitivním období (SHOEMAKER et al., 2007). Právě tyto skutečnosti činí z genu SOX 9 a jeho homologů možné kandidáty pro geny určující pohlaví.

3.3.4. Určení pohlaví u obojživelníků

Chromozomální mechanismus určení pohlaví u obojživelníků pravděpodobně neodpovídá žádnému schématu. Japonská žába *Rana rugosa* má populaci s heteromorfními pohlavními chromozomy XY, homomorfními XY a heteromorfními WZ (MIURA et al., 1998).

Změna pohlaví může být u některých zástupců obojživelníků ovlivněna i spontánně hormony nebo teplotou. Teplo či zima může zapříčinit změnu pohlaví u samců i samic v XY i ZW systémech. Tento fenomén je známý jako zvrát pohlaví (angl. sex reversal). Vliv teploty může zcela potlačit vliv genotypu, čímž umožňuje vznik populace s genotypovou a fenotypovou nesourodstí. Přesný mechanismus této přeměny není známý.

Geny určující pohlaví nejsou u obojživelníků známy. Gen *Dmrt1*, studovaný u druhu *Rana rugosa*, se ukázal jako autozomální. Během vývoje pulců je těsně před metamorfózou exprimován v intersticiálních a Seritoliho buňkách v testes. U pulců

s diferenciovanými varlaty nebyla nalezena žádná exprese Dmrt1. U dospělých žab je exprimován v intersticiálních, Sertoliho a germinálních buňkách varlat. Při maskulinizaci XX pulců testosteronovou injekcí začala změna pohlaví exprese Dmrt1. Dmrt1 tedy ovlivňuje diferenciaci varlat, ale nemusí u druhu *Rana rugosa* ovlivňovat určení samčího pohlaví (MIURA et al., 1998; AYOAMA et al., 2003).

3.3.4.1. *Xenopus laevis*

Xenopus laevis má určení pohlaví typu ZZ/ZW. To bylo dokázáno při zpětném křížení normálních jedinců s jedinci, u kterých byl proveden zvrát pohlaví. Ten byl u pulců indukován estradiolem. Všichni jedinci se vyvíjeli v samice, a to bez ohledu na jejich pohlavní chromozomy. Po křížení poloviny samic (s pohlavními chromozomy ZZ) s normálními samci (ZZ) vznikali pouze samci. Tímto byla dokázána u *X. laevis* heterogametnost samic (CHANG et al., 1955; CHANG et al., 1956).

YOSHIMOTO et al. (2008), izolovali u *X. laevis* gen s DM doménou, DM-W, což je paralog DMRT1. DNA vazebná doména DM-W vykazuje vysokou podobnost (89%) s DNA vazebnou doménou DMRT1. Transaktivační doména DM-W 1 ovšem žádnou podobnost s odpovídající sekvencí DMRT1 nevykazuje (YOSHIMOTO et al., 2008). Z toho plyne, že tyto proteiny mohou mít jako transaktivační faktory jinou funkci.

DM-W je exprimován u pulců *X. laevis* pouze v primordinálních buňkách a to v průběhu celého procesu určování pohlaví. Pro určení skutečné funkce tohoto genu vytvořili YOSHIMOTO et al. (2008) transgenní pulce s DM-W expresním vektorem. U některých pulců s určením pohlaví ZZ vyvolala ektopická exprese DM-W formování ovariálních dutin a ve vyvíjejících se gonádách vznik primárních oocytů. Na druhou stranu nevyvolala exprese DM-W u ZZ pulců ke vzniku zcela normálních vaječníků. Yoshimoto et al. se domnívají, že se DM-W se podílí na vývoji vaječníků, nicméně je možné, že je pro vývoj samičích gonád nezbytný i nějaký další faktor kooperující s DM-W, případně, že u samců existuje nějaký

faktor, který zabraňuje vzniku samičích pohlavních orgánů. Pro zjištění skutečné funkce DM-W při určování pohlaví je tedy nutné vytvořit transgenní jedince s tímto genem nefunkčním.

3.4. SYNTENIE

Syntenie je fyzická kolokalizace genetického lokusu na stejném chromozomu u více druhů. Přestavby v genomu v průběhu evoluce mohly oddělit dva lokusy od sebe. Tím docházelo ke ztrátám syntenii. Na druhou stranu mohly syntenie opětovně vznikat spojením dvou dříve oddělených částí genomu.

Sdílená syntenie je kolokalizace genů na chromozómu u příbuzných druhů. Tento termín je rovněž používán k popisu přesného pořadí genů na chromozómu, které pochází od společného předka. Velké syntenní oblasti mohou znamenat selekci funkčních vztahů mezi geny, jako jsou kombinace alel, které je výhodné dědit společně, nebo které mají společné regulační mechanismy. Syntenie, případně jejich separace, mohou být použity k určení fylogenetického vztahu mezi jednotlivými druhy a dokonce i odvození genomu druhů již vymřelých.

V genomice má analýza syntenii ve smyslu pořadí genů několik využití. Sdílená syntenie je jednou z nejjistějších kritérií pro určení orthologů genomických oblastí u odlišných druhů. Kromě toho může zachování syntenie znamenat důležitý funkční vztah mezi jejími geny. Například mezi různými živočišnými druhy zůstává zachováno pořadí genů v Hox clusteru, které jsou klíčovými determinanty tělního plánu u živočichů.

Syntenie může být identifikována rozpoznáním dlouhých konzervovaných sekvenčních oblastí, porovnáním konzervovaných proteinů v programu BLASTP, případně použitím obou těchto metod (MURAL et al., 2002). Statistika syntenních oblastí zahrnuje její délku a procentuální zastoupení sekvenční identity; procentuální zastoupení genomických sekvencí, které jsou syntenní; distribuci těchto oblastí v zastoupených genomech; zastoupení genů, jejich denzitu a pořadí v syntenních

oblasech; zastoupení DNA repetice. Výsledky mohou být znázorněny graficky a velmi často jsou doplněny popisem důležitých syntenických oblastí.

3.4.1. Srovnávací genomové mapování

Srovnávací genomika porovnává podobnosti a rozdíly genomů dvou či více druhů. Je aplikovatelná jak na celé genomy, tak na syntenické oblasti různých druhů, poddruhů i kmenů stejného druhu. Tyto metody pomáhají ujasnit fylogenetický kontext evolučních procesů (CLARKS, 1999).

Součástí srovnávacího mapování je i vývoj výpočetních programů a jejich použití pro analýzu genomů. V posledních letech bylo vyvinuto velké množství algoritmů pro porovnání a vizualizaci shod celých genomů (ALSCHUL et al., 1997). Většina algoritmů nejprve rozpozná velké zachované oblasti, na jejichž základě genomy seřadí a následně srovnává.

Genomy mohou být srovnávány na třech úrovních: na základě nukleotidové statistiky, genomové struktury na úrovni DNA a genomové struktury na úrovni genů. Na úrovni nukleotidové statistiky jsou porovnávány velikost genomu, procentuální zastoupení G-C bází, oblasti s rozdílným zastoupením G-C bází, použití kodonů a aminokyselin, zastoupení dinukleotidů a jejich distribuce. Při porovnání myšího a lidského genomu na této úrovni bylo například zjištěno, že je myší genom v syntenické oblasti s lidským genomem o 10% menší. Hlavní příčinou je nižší zastoupení DNA repetice u myší (MURAL et al, 2002).

Srovnání genomové struktury na úrovni DNA studuje chromozomální zlomy a změny v chromozómových fragmentech. Tato úroveň je důležitá především proto, že umožňuje studium synteníí nezachovaných na jednom chromozómu.

Chromozómové zlomy a další změny vedou ke změně pořadí genů. To je zkoumáno při porovnávání genomů na genomové úrovni. Studium přestaveb genomů je vhodné pro zjištění jejich příbuznosti. Na druhou stranu je takový výzkum velmi složitý, a to i s použitím moderní počítačové techniky.

Kromě genomů jako celků jsou při srovnávacím genovém mapování porovnávány i kódující a nekódující oblasti. Studium kódujících oblastí se zaměřuje na počet genů v genomu, jejich podobnost a rozdílnost, délku, zastoupení kodónů a jaká část genomu je kódující. Další úroveň analýzy se zaměřuje na proteiny, k čemuž je většinou používán program BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Nekódující oblasti jsou srovnávány především kvůli jejich velkému zastoupení v genomu. U člověka se například odhaduje na 97%. Dále se předpokládá, že mají nekódující oblasti vliv na regulaci transkripce, replikaci DNA a další biologické funkce. Srovnávací genomika napomohla k zjištění této skutečnosti porovnáním nekódujících oblastí DNA, ve kterých byly nalezeny velké zachované oblasti. Ty obsahují velké množství míst vhodných pro vazbu transkripčních faktorů (LEVI, 2001). Toto zjištění napomohlo k objevu regulačních elementů, které ovlivňují expresi velkého množství genů. Rovněž bylo zjištěno, že se specifita detekce regulačních oblastí zvýší při porovnávání genomů více než dvou druhů (DUBCHAK et al., 2000; MOUCHEL et al., 2001).

3.4.2. ZOO FISH

Pro fyzické srovnávací mapování je používána metoda Zoo FISH (SCHERTHAN et al., 1994). Alternativní název metody je mezidruhovému chromozómovému mapování. Jejím jediným rozdílem od klasické techniky FISH je ve využití jednoho typu DNA sond u preparátů pocházejících z více druhů zároveň. Vysoké zastoupení homologií usnadňuje použití této metody.

Používané sondy mohou značit genom buď celý a nebo jeho část. V případě použití značky, která u jednoho druhu značí celý chromozóm, lze u druhého druhu sledovat homologní oblasti na jednom či více chromozómech. Obdobné je to v případě použití sondy značící jedno raménko chromozómu. Sondy lze rovněž připravit z naštěpených chromozómů jednoho druhu, případně lze použít již

existující genomovou knihovnu. U druhého druhu je pak sonda použita ke značení příslušných homologních oblastí.

Nevýhodou metody je, že velikost rozpoznatelných homologních segmentů je asi 8-10 Mbp. Dalším nedostatkem je, že k nalezení přestaveb v rámci jednoho chromozómu není možné použít sondy značící celý chromozóm a většinou nejsou dostatečné ani sondy značící celé raménko. Právě tyto sondy jsou však používány nejčastěji. Na druhou stranu metoda umožňuje srovnávat velké oblasti až do velikosti celého chromozómu, kde existuje jisté omezení pro algoritmy používané v srovnávací genomice. V porovnání se srovnávací genomikou není při použití metody Zoo FISH nutný osekvenovaný genom obou studovaných druhů.

4. MATERIÁL

4.1. Žáby

Samci *X. tropicalis*, kmen Ivory Coast, chov PřF UK.

Samice *X. tropicalis*, kmen Ivory Coast, chov Dr. Nicolas Polet, Universite Paris Sud

4.2. Roztoky

Pokud není v protokolu uvedeno jinak, byly roztoky používány 1x koncentrované. Použitá H₂O byla vždy destilovaná.

- PBS (fosfátový pufr): 25 ml 1 M KH₂PO₄; 4 g NaCl; 500 ml H₂O, pH 7,4
- Etidiumbromid: 1 mg/1 ml H₂O
- BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM
- Holtfreterův roztok: 60mM NaCl, 1mM KCl, 2mM CaCl₂, 5mM NaHCO₃, pH 7- 7,5
- Krystalviolet: 2 mg/1 ml H₂O
- Krystalviolet pufr: 30% glycerol; 20 mM EDTA; 100 µg/ml krystalvioleti
- Long PCR pufr (Fermentas, Vilnius, Litva)
- Long PCR polymeráza (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 5x konc. TBE (Tris-borát-EDTA): 200 mM Tris; 10 mM EDTA; 450 mM H₃BO₃, pH 8,0
- Žabí fyziologický roztok: 2 mM EDTA; 2 ml 2/3 PBS

4.3. Kity

- ZR Genomic DNA II kit (Zymo research, USA)

- NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany)
- Zymoclean Gel DNA Recovery kit (Zymoresearch, USA)

4.4. Přístroje

- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)
- Centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Elektroforetický zdroj Consort E122 (Consort, Belgian)
- Vortex Ika Works, Minishaker MS1, (Ika Works, Wilmington, USA)
- Vodní lázeň Techne FTE 10DE (Techne, Cambridge, England)
- Termocyklér Techne FTGRAD FD (Techne, Cambridge, England)
- Termocyklér PTC 100 (MJ Research Inc., USA)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Spektrofotometr Shimadzu UV–1601 (Shimadzu Corporation, Japan)
- UV Transiluminátor TS-20E, 254 nm (UVP, ČR)
- Zářivkový transluminátor BASIC 2 (Kaiser prolit, Germany)
- CCD (z angl. Charge Coupled Device) černobílá kamera SPT-M320CE (Sony Corporation, China)
- Programy pro zpracování a analýzu obrazu DIPS a ACC (SOFO, Brno, ČR)
- Programy FastPCR, Excel

4.5. Primery

Kódy genů jsou katalogová označení z databáze <http://www.ensembl.org/index.html>

Vazebná skupina	LG 5	LG5	LG5	LG5
poloha cM	0	35	55	55
scaffold	667	137	239 (1)	239 (2)
gen	ENSXETG00000003943	ENSXETG000000019611	ENSXETG000000009764	ENSXETG000000009763
primer F	ATCCAGAAAAGCTGCGTTT GA	CACGATGCTGCCGTACTC TA	CTCCCACAGTCCCTGTGT TT	GCCAAAAGGCCAAGTTA GTG
Primer R	ACATACCTGCAGTGCCTC GT	GAAGTGGGAACGAATCA TGG	TCCTGAAAGTTCTGGCCAT TC	TGCAATGCCCTTGATCCAT AA
Intron	16-17	7-8	1-2	4-5
Vazebná skupina	LG 5	LG5	LG5	LG5
poloha cM	75	75	75	95
scaffold	518 (1)	518 (2)	518 (3)	166 (1)
gen	ENSXETG00000003670	ENSXETG00000003670	ENSXETG00000003677	ENSXETG000000000135
primer F	CTGCACCAAACTGTCTGC AT	AATGCAGGAATCCAGGA AAA	GATACAAAAGTCCGGGAA ATCA	ACTGAGGTGCAGCCAAA GTC
Primer R	TCCTGGATTCTTCGCAATTG AT	TAGGGACCACCAATTCCTG TT	TGGGTTCTTCGCTAGAC AG	GGTTCTCCGGTGAAAGTT GTT
Intron	7-8	6-7	4-5	3-4

Vazebná skupina	LG5	LG6	LG6	LG6
poloha cM	95	0	0	0
scaffold	166 (2)	403 (1)	403 (2)	403 (3)
gen	ENSXETG00000000135 GCTCGAAGAGACCCCTTACTC CA	ENSXETG0000000027111 AAGCTGCAATTGGCTGAA CAT	ENSXETG0000000027109 TGCCATTGCTCCTAAAGA TG	ENSXETG0000000027109 CCAAGACGTAGCTGGCTT TT
primer F	ATAGCAAGGCTTGTGGC AGT	CCGGACAACTTTAGCAC GAT	GGCTAAGCAACAGCCCA TC	AGGTCCCATCCATGTCAG AA
Primer R				
intron	5-6	8-9	2-3	1-2
Vazebná skupina	LG6	LG6	LG6	LG6
poloha cM	20	20	20	20
scaffold	307 (1)	307 (2)	307 (3)	307 (4)
gen	ENSXETG000000010384 CTGGATCCATTCCAGCAG AT	ENSXETG000000018630 TGCTACGATGAGGGG AAA	ENSXETG000000015993 CTTTCAGCAGTTCCCAGA GG	ENSXETG000000018646 ACGGAAATCGAGGCTTC TTT
primer F	TCCGTGTATGCAACGGA GTA	CGCACTTGACCCCTCTCAG AA	GCATTTGGAAATCATGCT CA	CAACATTCCTTCAGCCCA GT
Primer R				
intron	3-4	2-3	1-2	4-5

Vazebná skupina	LG6	LG6	LG6	LG6
poloha cM	40	40	60	80
scaffold	689 (1)	689 (2)	9	219 (1)
gen	ENSXETG00000026124	ENSXETG00000014637	ENSXETG00000026489	ENSXETG00000010436
primer F	TGCTGAAAGGAATTAGGT CAACAT	AGAAAGGCCACCAGGA GATT	GAGCTGTCAGAGCTTCC TG	CACGACAAAGGTCACAT TGC
Primer R	ATACCTTCGCTGCAAGTT GG	CTCGTCACTTTCAGGGG TTC	CAGAAATGTGGGGATTTT CG	GATACGCTCACCGTCTGT CA
intron	4-5	3-4	2-3	4-5
Vazebná skupina	LG6	LG6	LG6	LG6
poloha cM	80	100	100	100
scaffold	219 (2)	862 (1)	862 (2)	862 (3)
gen	ENSXETT00000022903	ENSXETG00000009909	ENSXETG00000009908	ENSXETG00000009908
primer F	GTTGATTCCAAAGGGACT GA	CCACAGCAATGTCGTTG AAA	CGTAGGATGTGGGGAGA GAG	CGCTTGGCCTCTTTCTAT GA
Primer R	TATGATGGCTGTTGGCTT CA	GTCATCTTCCCCGTGAG CTA	ACAGGCATGTTGGAGGT GTT	GTGACAGGGTCGGAGAA ATC
Intron	9-10	1-2	4-5	7-8

Vazebná skupina	LG7	LG7	LG7	LG7
poloha cM	2	27,24	49	58
scaffold	62	82	6	288
gen	ENSXETG00000007610	ENSXETG000000003979	ENSXETG000000003083	ENSXETG000000002339
primer F	CAC TTGGCTCCTCAGACA CA	TCAC TGTCTCCTAGGGTTG GT	CAGTGAGACAAAAACGC AGAAT	CAAGCTGTGCAACCAGA TGT
Primer R	AAGCTTCATGCAATGCTG TG	GGCACTCTCCTTATGCAC ATC	TGTCAGCAATCTCCCGTG TA	TTGGCCATGAACTGCAA ATA
intron	6-7	1-2	2-3	6-7

5. METODY

5.1. Navržení primerů pro PCR

Na základě stávající vazebné mapy (<http://tropmap.biology.uh.edu/map.html>) jsem k jednotlivým SSR markerům našla příslušné unikátní scaffoldy ve vzdálenosti 20cM. Tato vzdálenost byla zvolena z důvodu, že Dr. Lyle Zimmerman (National Institute of Medical Research, London, UK)) sledoval vazbu mezi genem a centromerou a zjistil, že při jejich vzdálenosti 20 cM je vazba prokazatelná i při následném testování 40-50 potomků (osobní sdělení).

V příslušných scaffoldech jsem za pomoci genomové databáze Ensembl (http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/index.html) vyhledala vhodné geny s vhodnými introny pro následnou analýzu intronových polymorfizmů. Unikátnost okrajové exonové sekvence a velikost intronů jsem zkontrolovala v databázi JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html>).

Pro účely PCR amplifikace jsem v programu Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) na základě první unikátní exonové sekvence navrhla levý a na základě druhé pravý primer. Optimální teplota annealingu byla v programu nastavena na 58-62°C.

Nakonec jsem kvalitu primerů a případnou možnost tvorby dimérů zkontrolovala programem Fast PCR.

5.2. Odběr krve

Krev jsem odebírala z pažní nebo stehenní žíly dospělých žab. Jehlu jsem vydezinfikovala namočením v 500mM EDTA. Po napíchnutí žíly jsem omývala vytékající krev žabím fyziologickým roztokem a zachytávala jí do zkumavky.

Krev jsem používala k izolaci DNA. Skladovala jsem jí při -20°C.

5.3. Izolace DNA z krve

K izolaci DNA z krve jsem používala ZR Genomic DNA II kit (Zymo research). Použitá krev pro izolaci byla čerstvá nebo zamražená, vždy zředěná žabím fyziologickým roztokem.

Do 50 μ l krve jsem přidala 400 μ l Genomického lyzačního pufru a důkladně zvortexovala 10s. Směs jsem přenesla do Zymo-spin kolonky ve sběrné zkumavce a centrifugovala na 14500 ot./min 1 minutu. Obsah sběrné zkumavky jsem vylila. V následujícím promývacím kroku jsem na kolonku nanasla 500 μ l g-DNA promývacího roztoku, jednu minutu centrifugovala a poté jsem sběrnou zkumavku vylila. Promývací krok jsem zopakovala ještě jednou. Nakonec jsem přenesla kolonku do čisté mikrocentrifugační zkumavky, přidala do kolonky 50 μ l injekční vody, dvě minuty jsem nechala inkubovat při pokojové teplotě a nakonec centrifugovala 30s při 14500 ot./min. čímž došlo k vyvázání DNA z kolonky.

Izolovaná DNA byla skladována při teplotě -20°C. Množství vyizolované DNA tímto postupem bylo 2,5-11 μ g.

5.4. Izolace DNA z tkání

Pro izolaci DNA z tkání jsem používala NucleoSpin Tissue kit. DNA jsem izolovala z jater dospělých žab a z pulců. Tento kit nebyl vhodný pro izolaci DNA z krve, protože se velmi snadno zanášela kolonka. To vedlo k nulovým výtěžkům.

Pulce jsem dala do mikrocentrifugační zkumavky a přidala 180 μ l pufru T1 a 25 μ l roztoku proteinázy K. Jaterní tkáň bylo třeba před tímto krokem rozmělnit na co nejmenší kousky a do jedné zkumavky dát asi 25 mg tkáně. Vzorky jsem důkladně zvortexovala a inkubovala přes noc v třepačce při 56°C. Doporučená inkubace 3 hodiny se ukázala jako nedostatečná a vedla k nižším výtěžkům DNA. Před lyzačním krokem jsem vzorky zvortexovala, poté přidala 200 μ l B3 pufru, opět důkladně zvortexovala a nechala inkubovat 10 minut při 70°C. Po tomto kroku nesměly zůstat ve vzorku žádné nerozpuštěné části. Pokud se tak stalo,

centrifugovala jsem takový vzorek 5 minut na 14500 otáček a supernatant přenesla do nové zkumavky.

V následujícím kroku jsem ke vzorku přidala 210 μ l 96% etanolu a důkladně zvortexovala. Celý obsah zkumavky jsem přenesla do NucleoSpin kolonky ve sběrné zkumavce, 1 minutu centrifugovala při 14500 ot./min. Obsah sběrné zkumavky jsem vylila. Při prvním promývacím kroku jsem do kolonky přidala 500 μ l pufru BW, centrifugovala při 14500 otáčkách a vylila sběrnou zkumavku. Při druhém kroku jsem přidala 600 μ l pufru B5, centrifugovala 1 minutu a opět vylila obsah sběrné zkumavky. Druhý promývací krok jsem zopakovala. Nakonec jsem pro vysušení membrány centrifugovala vzorky 1 minutu, přenesla kolonku do nové 1,5 ml zkumavky, přidala do kolonky 100 μ l elučního pufru BE, předem ohřátého na 70°C, 1 minutu inkubovala při pokojové teplotě a pak centrifugovala 1 minutu na 14500 otáček.

Izolovaná DNA byla skladována při teplotě -20°C. Množství vyizolované DNA tímto postupem bylo 6-30 μ g.

5.5. Izolace DNA z agarózového gelu

Pro izolaci DNA z izolačního gelu jsem používala Zymoclean DNA Recovery kit. Použitý agarózový gel byl 0,8% nebo 1%.

Fragment DNA vyříznutý z agarózového gelu jsem zvážila a umístila do 1,5 ml zkumavky. Do té jsem přidala trojnásobné množství (v μ l) pufru ADB na každý mg vyříznutého gelu. Vzorky jsem inkubovala 5-10 minut při 45°C, dokud se gel ve zkumavce zcela nerozpustil. Vzorek jsem přenesla do Zymo-Spin kolonky ve sběrné tubě, centrifugovala 1 minutu při 14500 otáčkách, obsah sběrné zkumavky vylila, do kolonky přidala 200 μ l promývacího pufru (Wash) a centrifugovala 30 sekund při 14500 otáčkách. Obsah sběrné zkumavky jsem vylila a promývací krok zopakovala.

Před eluací DNA jsem umístila kolonku do nové 1,5ml zkumavky, do kolonky nanesla 8µl injekční vody a centrifugovala 30 sekund při 14500 otáčkách. Získanou DNA jsem buď ihned použila, nebo skladovala při teplotě -20°C.

5.6. Long PCR (polymerase chain reaction)

Reakční směs pro PCR reakci:

- 0,5 µl Long PCR enzyme mix (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 5 µl 10x long PCR pufr s Mg^{2+} (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 1 µl DTP 10µM (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 2 µl L primer o koncentraci 25 µM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 2µl R primer o koncentraci 25 µM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 150 µg DNA
- doplněno injekční vodou do 50 µl

Reakční směs jsem připravovala sterilně na ledu a převrstvila ji parafínovým olejem. Při přípravě více než pěti vzorků jsem připravovala premix.

Program pro PCR byl upraven podle velikosti intronů (3-5kBp)

1. 94°C 1min
2. 94°C 20sekund
3. 59°C 30 sekund
4. 68°C 4 minuty
5. Krok 2-5 opakovat 10x
6. 94°C 20 sekund
7. 59°C 30 sekund
8. 68°C 6 minut
9. Krok 6-8 opakovat 25x
10. 68°C 10 minut
11. 4°C

PCR amplifikáty jsem skladovala při -20°C po dobu maximálně jeden měsíc. Kontrolu amplifikace jsem prováděla na 1% agarózovém gelu, na který jsem nanesla předem smíchané 3µl PCR amplifikátu s 6µl H₂O a 3µl BFM.

5.7. Restrikce

Restrikční směs: 2 µl příslušného pufru (viz tabulka 2.)

1µl restriktáza

3-6 µl PCR amplifikátu (podle výtěžku PCR reakce dle kontrolní elektroforézy), případně 5ml DNA izolované a přečištěné DNA z elektroforézového gelu

doplněno do 20 µl injekční vodou

Pro restrikci jsem používala dva typy restriktáz- normální a tzv. rychlé (FAST) restriktázy. Při použití normálních restriktáz jsem inkubovala reakční směs 1,5 hodiny při teplotě 37°C, u rychlých restriktáz byla délka restrikce 8-10 minut. Reakci jsem zastavila přidáním 6 µl BFM a ihned použila pro analýzu na elektroforézovém gelu, případně skladovala při -20°C maximálně do druhého dne.

Restriktáza	Pufr
HpaII, Rsa	Tango
MboI, MluI	R pufr
Fast restriktázy	Fast digest buffer

tabulka 2. Použité restriktázy a pufrů pro restrikci

5.8. Kontrolní elektroforéza

DNA (PCR amplifikáty, restrikční fragmenty) jsem analyzovala na 1%, 0,8% nebo 3% agarózovém gelu. Pro kontrolní elektroforézy jsem do gelu přidala etidiumbromid v koncentraci 1 µg/1 ml gelu, ke vzorkům pak 1/3 objemu

bromfenolové modři (BFM). Jako velikostní DNA marker jsem používala Gene Ruler DNA Ladder mix (Fermentas, Vilnius, Litva).

Elektroforéza PCR amplifikátů probíhala v TBE pufru pod stálým napětím 80 V. Vzorky jsem analyzovala na UV transiluminátoru při vlnové délce 254 nm a snímala CCD černobílou kamerou.

5.9. Izolační elektroforéza

Pro izolaci jsem používala 0,8% agarózové gely, do kterých jsem přidala krystalviolet v koncentraci 1,6 µg/1 ml gelu a ke vzorkům pak krystalvioletový pufr. DNA jsem vizualizovala na zářivkovém transluminátoru a příslušné bandy o požadované velikosti jsem vyřezávala skalpelem.

5.10. Měření koncentrace DNA

Koncentraci DNA jsem stanovovala spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm. 6 µl vzorku jsem zředila 594 µl destilované vody (100x zředěno). Jako blank jsem používala stejnou vodu, ve které jsem ředila vzorek.

Pro zjištění koncentrace DNA jsem použila vzorec

$$\text{koncentrace (ng/ml)} = \text{absorbance} \times \text{zředění} \times 50$$

5.11. Umělé oplození

5.11.1. Izolace varlat

Po anestezii dospělého samce *X. tropicalis* pomocí MSS (ethylester p-aminobenzoové kyseliny) jsem jej usmrtila dekapitací. Poté jsem provedla nástřih břišní stěny a z břišní dutiny vyjmula obě varlata. Spermie z varlat jsem používala pro okamžité oplození.

5.11.2. Získání oocytů a umělé oplození

U samice jsem navodila ovulaci injekcí lidského chorionického gonadotropinu (hCG) do lymfatického vaku. Samice byla přemístěna do samostatného boxu, voda měla teplotu 20-22°C.

Den předem jsem injikovala samici 10 jednotek hCG (100U/ml), v den umělého oplození dalších 200 jednotek. Po 2-3 hodinách, kdy bylo možné pozorovat první nasnášené oocyty, jsem samici uchopila a tlakem na břišní dutinu uvolnila cca 200 oocytů na připravenou Petriho misku. Oocyty jsem po té roztáhla do jedné vrstvy.

Spermie pro umělé oplození byly připraveny následujícím postupem. Varle jsem umístila do 0,5 ml Holtfretrova roztoku s 0,1% BSA a nůžkami jej rozstříhala na několik menších kousků. Po několika minutové inkubaci jsem spermiovou suspenzi rovnoměrně nakapala na oocyty a nechala 2-3 minuty stát. Po té jsem Petriho misku zalila pramenitou vodou.

5.12. Pulci

Oplozené oocyty jsem nechala vyvíjet v Petriho misce tři dny. Nevývíjející jedince jsem z misky odstraňovala a pulce ve stádiu končetinového pupenu jsem přemísťovala do akvária s vodou o teplotě asi 25°C. Pulce jsem krmila jednou denně krmením pro potěr (SERA micron) a sušenými, nejemno rozemletými kopřivami rozmočenými ve vodě (Sušené kopřivy, listy a nať).

5.13. Dospělí jedinci

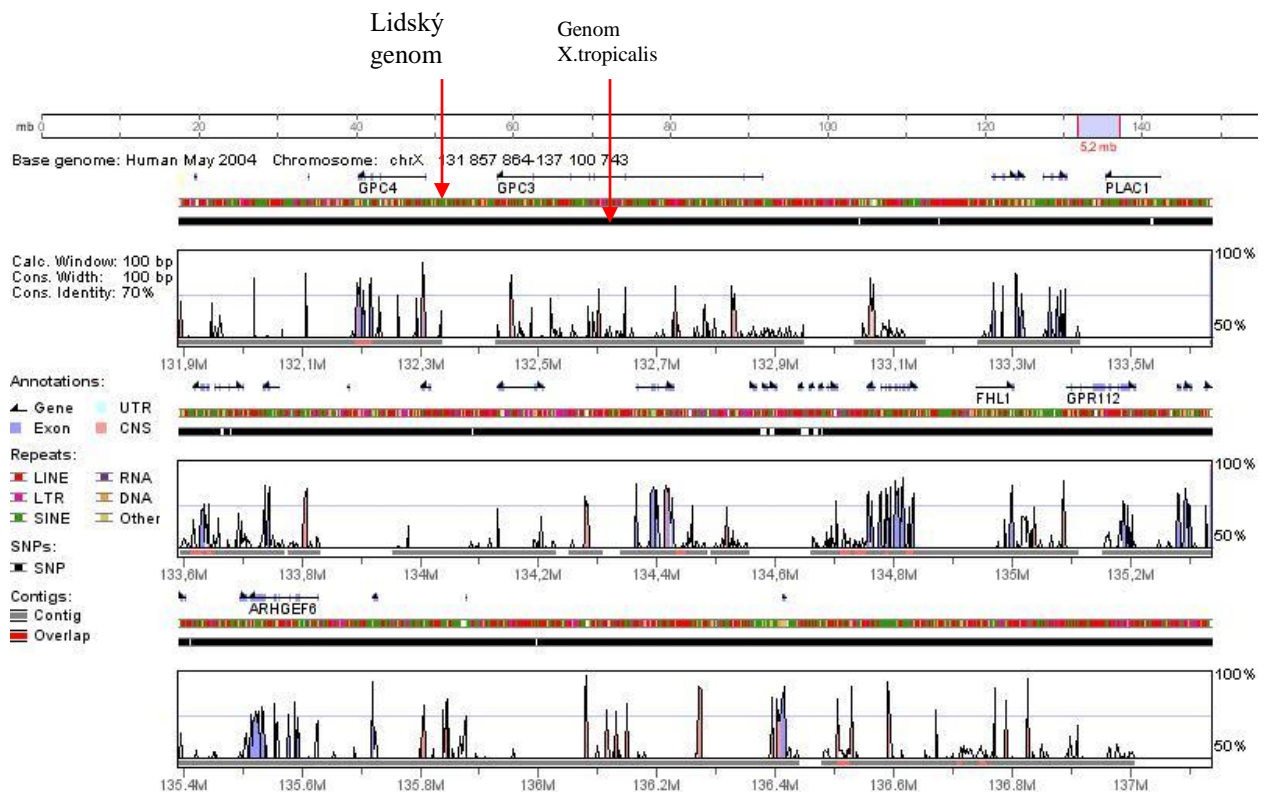
Pulce přeměňující se v žáby jsem přemístila do nového akvária. Malé žáby jsem krmila třikrát týdně škrábaným masem. Dospělí jedinci byli krmeni škrábaným masem dvakrát týdně. Teplota vody v akváriích byla vždy asi 25°C, akvária se nacházela ve vytápěných místnostech.

6. VÝSLEDKY

6.1. Strategie nalezení vhodných vazebných skupin pro identifikaci genu určujícího pohlaví

6.1.1. LG 5

Ve vazebné skupině 5 (LG5 – chromozóm 10) se nachází velká syntenní oblast s lidským chromozómem X (viz. Obr.1). Syntenie byla nalezena pomocí databáze JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html>), která srovnává genom *X. tropicalis* s genomem lidským. Pomocí programu VISTA browser (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>) byla získaná data převedena do grafické podoby. Největší syntenní oblastí s lidským chromozómem X je scaffold 31. Zde se nachází i RBMX, což je jeden z kandidátních genů pro určení pohlaví u *X. tropicalis*.

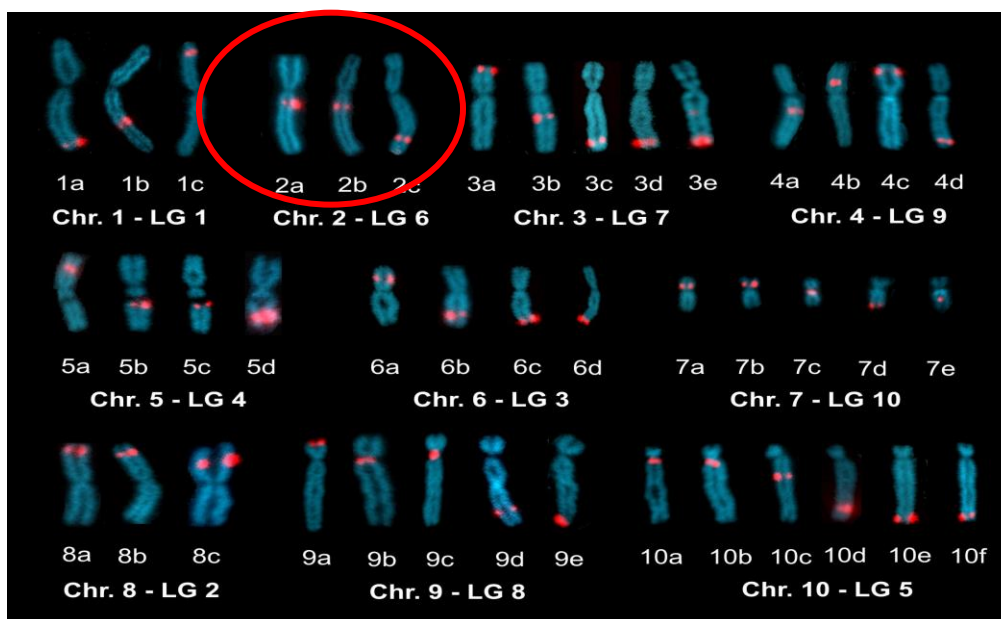


Obr.1. Graf syntenie lidského chromozómu X a scaffoldu 31 zobrazený v programu VISTA browser. Modré píky ukazují synteni v exonech, červené v intronech.

6.1.2. LG6

Fyzické mapování chromozómu 2 (vazebné skupiny 6) ukazuje, že není vazebně zmapováno jeho p rameno (ústní sdělení, V. Krylov) (viz Obr.2). Důvodem může být zákaz rekombinace v dané oblasti, což by napovídalo o výskytu nehomologních oblastí, které spolu nerekombinují. Takové oblasti se vyskytují právě na pohlavních chromozómech.

Druhým důvodem pro nemožnost zmapování dané oblasti může být malý, případně žádný, výskyt zvolených genetických markerů. Autoři vazebné mapy <http://tropmap.biology.uh.edu> používají jako markery SSR sekvence, které ovšem nejsou v genomu *X. tropicalis* rozmístěny rovnoměrně. Vhodně zvolené markery, jakými by mohly být právě intronové polymorfizmy, by mohly tento problém vyřešit.



Obr.2: Přiřazení vazebných skupin k příslušným chromozómům (Krylov et al. – data připravená do publikace). U chromozómu 2 (LG 6) se nepodařilo fyzicky mapovat p rameno. Sonda 2a se nachází na úrovni 2 cM. Orientace vazebné skupiny je ve směru p-q.

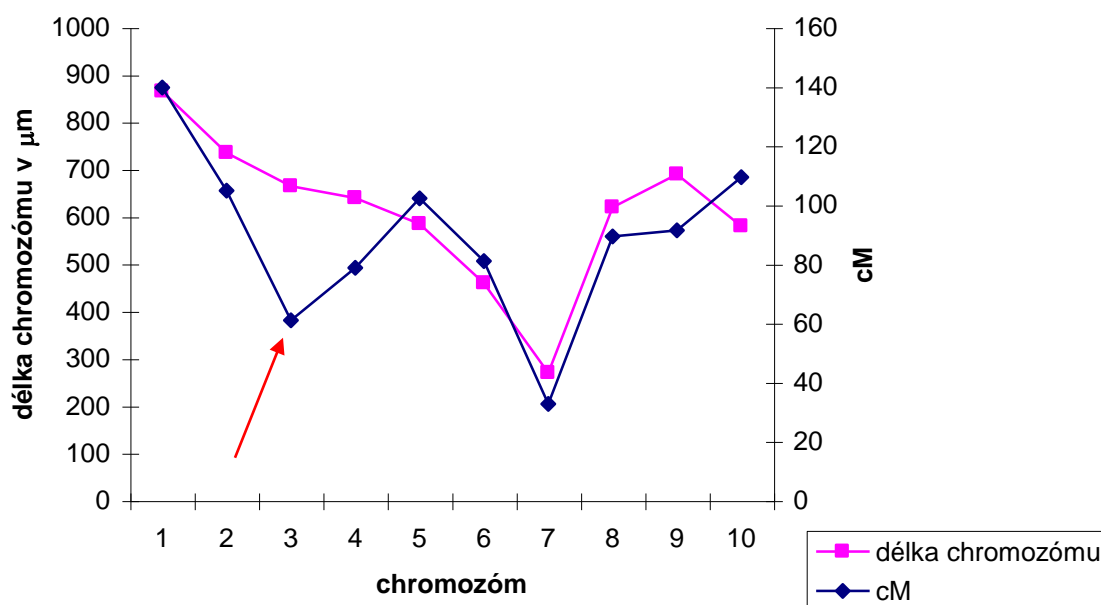
Posledním důvodem, proč byla vazebná skupina 6 určena jako kandidátní pro pohlavní chromozóm je fakt, že i zde byly nalezeny menší oblasti syntenní s lidským chromozómem X.

6.1.3. LG7

Vazebná skupina 7 (chromozóm 3) vykazuje oproti ostatním LG velký rozdíl mezi délkou chromozomu a příslušné vazebné skupiny v cM (viz Graf 1). Délky jednotlivých chromozómů v μm byly převzaty z grafického vyjádření karyotypu *X. tropicalis* v publikaci Tymowska (1973). Z tohoto důvodu tyto hodnoty nejsou reálné.

U jednotlivých chromozómů kolísá poměr cM/Mbp od 0,33 po 0,68 (viz Tab.3). Nejmenší poměr vykazuje LG7 (0,33), což společně s daty z předcházejícího grafu (viz Graf 1) svědčí o nízké rekombinaci a tedy možné přítomnosti genu určujícího pohlaví v této vazebné skupině.

Vztah mezi délkou chromozomu a příslušnou LG



Graf 1. *Vztah délky chromozómů X. tropiacalis v mm a jejich příslušných vazebných skupin v cM.*

Výpočty k následující tabulce byly provedeny dosazením do následujícího vzorce:

$$\text{Počet bází v chromozómu} = \text{relativní délka} \times \text{celkový počet bází}$$

$$\text{Celkový počet bází } X.\text{tropicalis} = 1,7 \times 10^9$$

Chromozóm	Vazebná skupina	Relativní délka	cM	Mbp	cM/Mbp
1	LG 1	0,142	139,78	240	0,57904
2	LG 6	0,12	104,9	204	0,51422
3	LG 7	0,109	61,03	185	0,32936
4	LG 9	0,105	78,8	178	0,44146
5	LG 4	0,096	102,25	163	0,62653
6	LG 3	0,075	81,02	128	0,63545
7	LG 10	0,044	32,74	75,1	0,4377
8	LG 2	0,101	89,33	172	0,52027
9	LG 8	0,113	91,48	192	0,47621
10	LG 5	0,095	109,37	161	0,67721

Tabulka 3. *Relativní délka, vazebná délka, počet bází a jejich poměry u jednotlivých chromozómů. Žlutě je zvýrazněná velká odchylka u chromozómu 3(LG7) oproti ostatním. Relativní délka chromozómů převzata z Tymowska (1973).*

6.2. Strategie vyhledávání intronů pro vazebné mapování

Pro následující studie byly použity čtyři samci z chovu přírodovědecké fakulty. Vzhledem k požadované variabilitě mezi rodičovskými genomy pro následné křížení bylo druhé pohlaví zastoupeno samicí z francouzského chovu (Dr. Nicolas Polet, Université Paris Sud). Pro studium intronových polymorfizmů byly z důvodů následného vazebného mapování pro nalezení genu (genů) určujícího pohlaví použity introny z LG 5, LG 6 (viz výše). V LG7 byly nalezeny intronové polymorfizmy výhradně pro účely vazebného mapování, podrobnější studie nebyla provedena.

Ve vazebné mapě jsem vyhledala unikátní scaffoldy ve vzdálenosti 20 cM. Jedinou výjimkou byla LG 5, která nemá v oblasti 1-35cM žádné mapované markery. Proto byly použity nejbližší možné scaffoldy (166 a 137).

V databázi http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/index.html jsem ve zvolených scaffoldech náhodně vybrala geny poskytující okrajovou sekvenci pro nasednutí primerů pro PCR amplifikaci. Při jejich výběru byla jediným omezením velikost intronů. Vlastnosti ani velikost samotných genů, v nichž se introny nacházejí, nebyly důležité. Většinou jde o strukturní geny, které nemají jméno, pouze katalogové označení. Z tohoto důvodu jsou pro označení jednotlivých intronů v textu použita čísla scaffoldů, ve kterých leží. Různé geny, resp. introny ve stejném scaffoldu jsou odlišeny pořadovým číslem. V LG7 byly použity introny fyzicky zmapovaných genů.

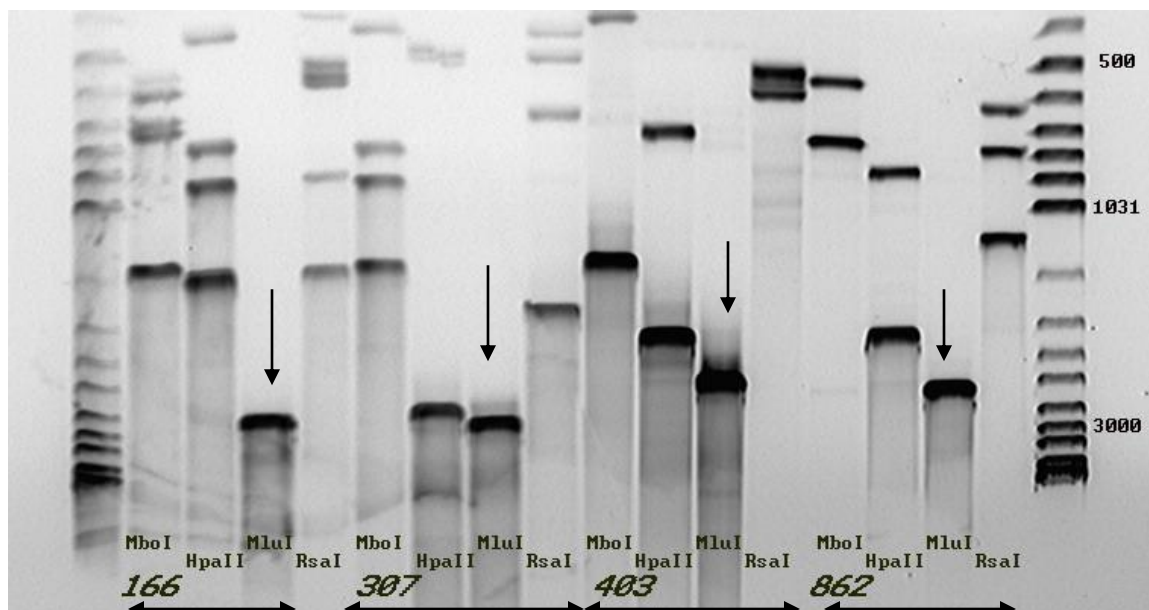
Velikost prvních testovaných intronů byla 3-5 kbp. Očekávali jsme, že na výskyt polymorfíí bude mít vliv jejich velikost. Tato domněnka se ovšem nepotvrdila, polymorfie se vyskytovaly hojně i u intronů menších (2-3kbp). Na druhou stranu měly větší introny (4-5 kbp) nižší, případně žádné, výtěžky při PCR amplifikaci. Z tohoto důvodu je nejlepší pro vazebné mapování použít introny o velikosti 2-3,5 kbp.

6.3. Identifikace vhodných restriktáz

Původně bylo zamýšlené použít pro identifikaci intronových polymorfizmů čtyři různé restriktázy- Mbo I, Hpa II, Mlu I a Rsa I (viz Obr.3). Čím častěji restriktázy štěpí, tím je možné nalézt větší množství polymorfíí a rovněž je snazší identifikace heterozygotů.

Všechny uvedené restriktázy patří mezi často štěpící, nicméně se po jejich otestování na několika intronech ukázalo, že štěpí s rozdílnou frekvencí. Zatímco při použití restriktáz Mbo I, Hpa II a Rsa I nebyl rozdíl v počtu bandů na elektroforéze nijak výrazný, restriktáza Mlu I neštěpila introny ani v jednom případě. Důvodem je pravděpodobně velmi nízké zastoupení rozpoznávané

sekvence ACGCGT v intronech druhu *Xenopus tropicalis*. Z toho důvodu byla tato restriktáza z následného testování zcela vyloučena.



Obr.3. Štěpení intronů ve scaffoldech 166 (1), 307 (1), 403(1) a 862(1) restriktázami MboI, HpaII, MluI a RsaI. Restriktáza MluI introny neštěpí.

Pro nalezení konkrétní restriktázy pro konkrétní intron je již nutné postupné otestování všech výše uvedených restriktáz.

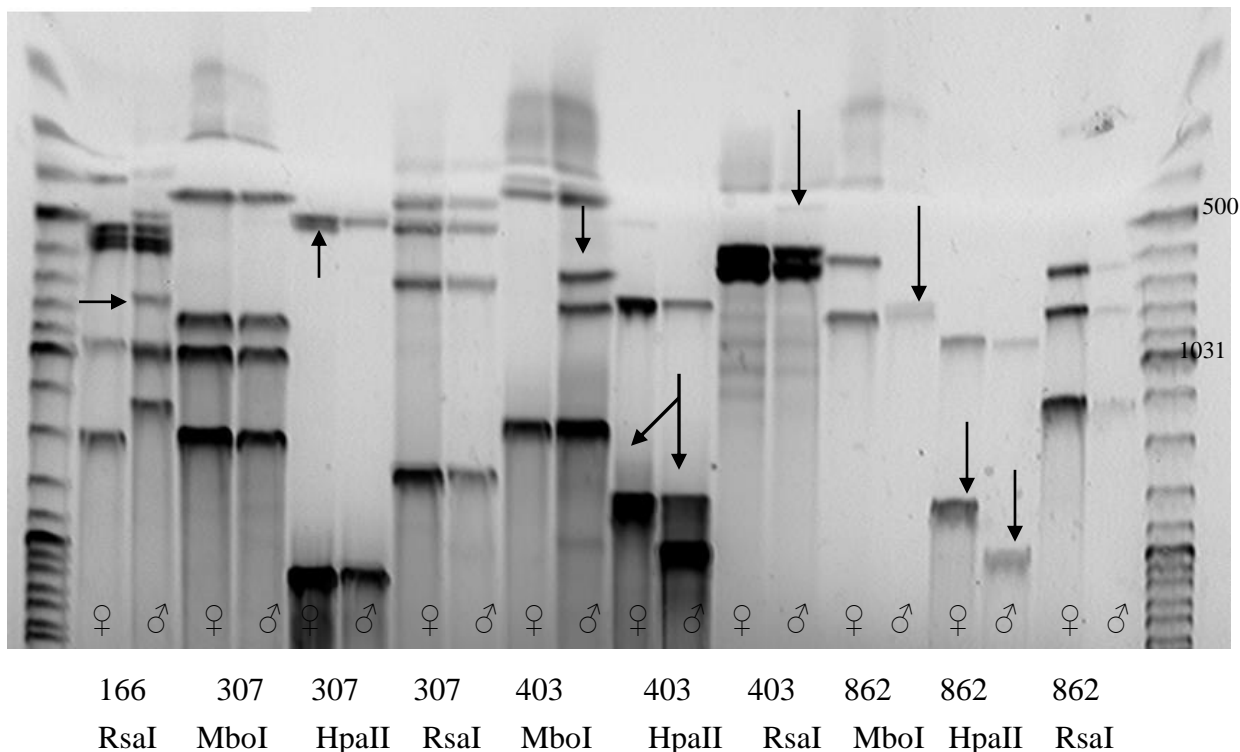
6.4. Intronové polymorfizmy

Vazebná skupina	Poloha (cM)	Intron	Gen	Intron	Mbo I	Hpa II	Rsa I
5	0	667	ENSXETT00000008549	16-17		x	x
	35	137	ENSXETT0000004244	7-8		x	x
	55	239 (1)	ENSXETT00000021512	1-2			x
	75	518 (1)	ENSXETT00000021512	7-8			
	75	518 (2)	ENSXETT00000007916	6-7	x	x	x
	95	166 (1)	ENSXETT00000000264	3-4	x	x	x
6	0	403 (1)	ENSXETT00000011532	8-9	x	x	
	20	307 (1)	ENSXETT00000022809	3-4		x	
	40	689 (1)	ENSXETT00000032045	4-5	x	x	x
	60	9	ENSXETT00000038203	2-3		x	x
	80	219 (1)	ENSXETT00000022903	4-5	x		x
	100	862 (1)	ENSXETT00000021826	1-2	x	x	

Tabulka 4. *Výskyt intronových polymorfizmů v intronech nacházejících se ve vazebných skupinách 5 a 6. Porovnávání jedinci byli ♀ a ♂. „x“ v tabulce znamená, že byl v intronu při použití dané restriktázy nalezen polymorfizmus.*

Výskyt intronových polymorfizmů byl při použití výše uvedených restriktáz velmi vysoký a jejich identifikace byla velmi jednoduchá (viz obr.4). Jak ukazuje tabulka 4, při testování dvanácti různých intronů rozprostřených ve vazebných skupinách 5 a 6 nebyl pouze v jednom případě nalezen žádný polymorfizmus. Při použití restriktázy Hpa II byly nalezeny polymorfizmy v 75% intronů, u RsaI v 67% a u Mbo I v 50%.

Po restrikci intronu 518 (1) nebyl nalezen mezi dvěma jedinci žádný polymorfizmus. Na druhou stranu u intronu 518 (2) byly nalazeny polymorfizmy ve všech třech případech restrikce. Zajímavé je, že se oba introny nacházejí ve stejném genu a intron 518 (2) je oproti genu 518 (1) menší (2000 bp x 3500 bp).

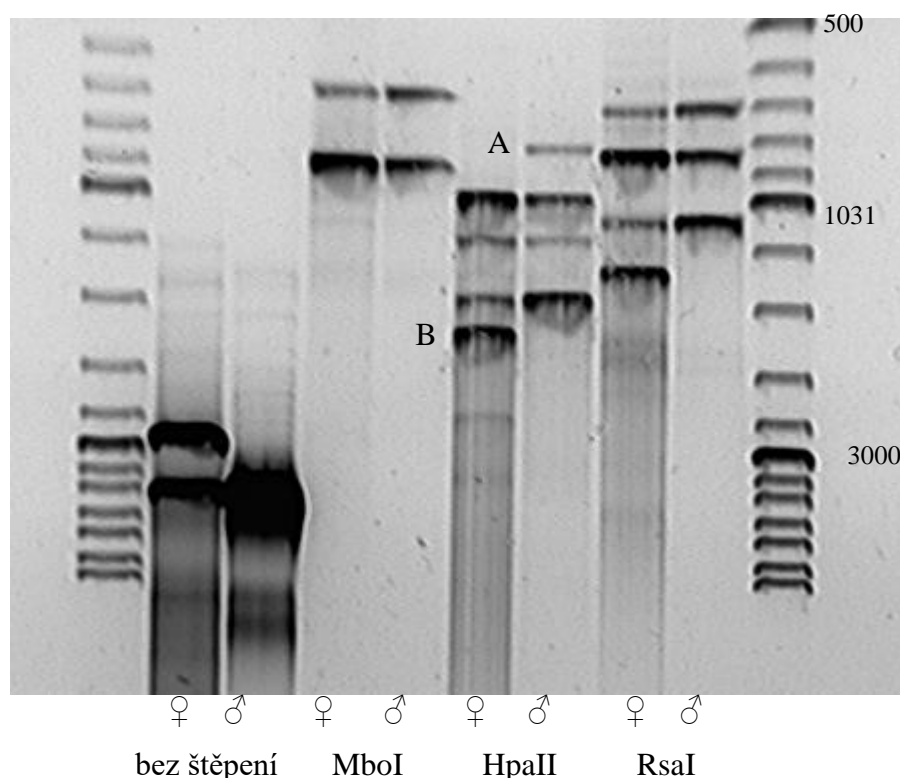


Obr.4: *Výskyt intronových polymorfizmů je velmi hojný a na elektroforézovém gelu je velmi snadné je rozeznat. V prvním řádku je uvedeno pohlaví testovaného jedince, ve druhém scaffold, ve třetím restriktáza. Introny 166(1), 307 (1), 403 (1) a 862 (1). Porovnávání jedinci byli ♀ a ♂.*

Rozdíly mezi introny se vyskytují i v jejich délce. V takovém případě není nutná pro nalezení polymorfizmu restrikce.

6.5. Identifikace heterozygotů

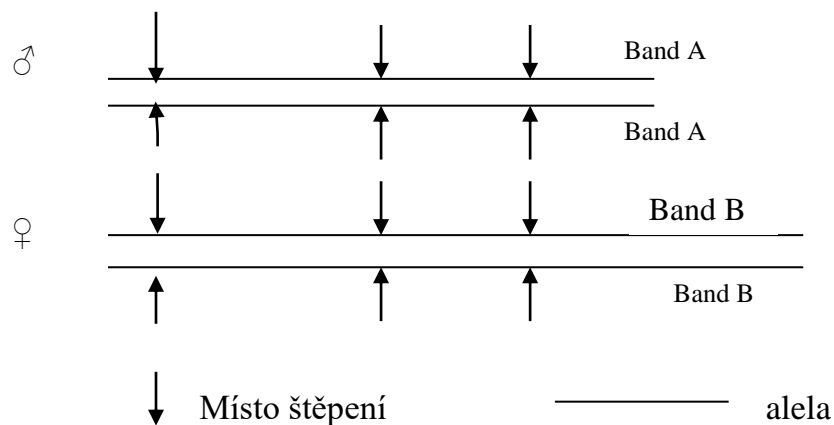
Obecně existují tři možné způsoby, jak identifikovat heterozygotního jedince. Nejjednodušší je výskyt dvou různě dlouhých alel jednoho intronu. V tomto případě není nutná restrikce a rovněž odpadá nutnost kontrolního křížení (viz Obr. 5 , bez štěpení).



Obr. 5: Intron ve scaffoldu 137. Samice má dvě různě dlouhé alely jednoho intronu. Při štěpení *MboI* se ale polymorfie mezi samcem a samici nevyskytuje. Restrikce *HpaII* není pro vazebné mapování vhodná- oba jedinci mohou být homozygotní i heterozygotní, band A a band B se mohou vyskytovat u obou jedinců na obou alelách, proto je nutné křížení. Při štěpení *RsaI* je na druhou stranu jasné, že je samice heterozygotní- navíc se vyskytuje pouze jeden band.

Druhý způsob je výskyt nadbytečného bandu v porovnání s jiným jedincem. V tomto případě je nutné, aby byly pokud možno všechny bandy po štěpení stejné a jeden, případně více bandů, se vyskytovaly navíc pouze u jednoho jedince. Pokud

jsou bandy navíc u obou porovnávaných jedinců, může se jednat pouze o různě dlouhé varianty stejného štěpného produktu (viz Obr.6) a oba jedinci mohou být homozygotní. V takovém případě je nutné testování potomků.




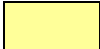
Obr. 6: Bandy A a B jsou různě dlouhé varianty stejného štěpného produktu. Oba jedinci jsou homozygotní, všechny bandy s výjimkou A a B jsou stejně dlouhé (možná situace na obr.5, restrikce *HpaII*).

Z přiložených elektroforeogramů je zřejmé, že pro identifikaci heterozygotních jedinců je výhodnější porovnávat příbuzné jedince. Ti mají velmi často na elektroforéze po restrikci podobný výskyt bandů. Proto je rozeznání heterozygota s nadbytečným bandem jednodušší, než při porovnávání nepříbuzných jedinců s větším množstvím odlišností.

Celkové výsledky testování intronových polymorfismů jsou shrnuty v Tab.5 a 6. Pro testování výskytu polymorfii v intronech u většího množství jedinců byly použity introny a příslušné restriktázy, u kterých byly objeveny polymorfizmy v předešlé studii (viz tab.4).

LG 5						
Intron		♂1	♂2	♂3	♂4	♀
667 (1)	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
137	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
239(1)	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
518(2)	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
166(1)	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					

 Mezi jedinci se vyskytuje polymorfie

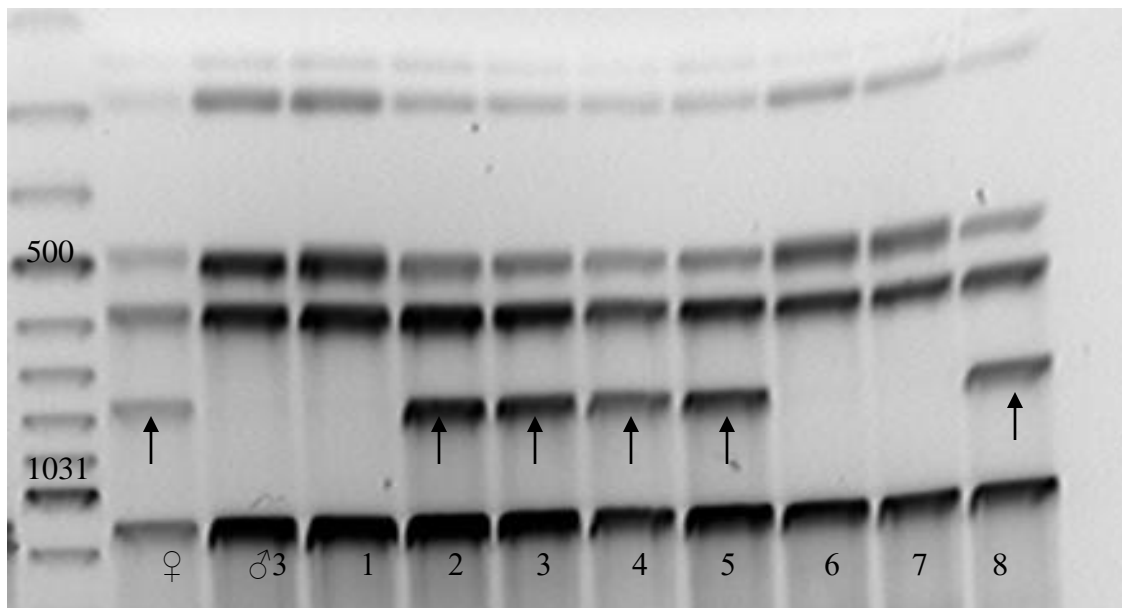
 Jedinci nevykazují polymorfii

Tabulka 5: Použita byla vždy restriktáza *RsaI*. Porovnávání jedinci mají znázorněný výskyt polymorfie na šachovnici.

LG 6						
Intron		♂1	♂2	♂3	♂4	♀
403 (1) HpaII	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
307 (1) HpaII	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
689 (1) HpaII	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
689 (1) RsaI	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
9 RsaI	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
219 (1) RsaI	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					
862 (1) HpaII	♂1					
	♂2					
	♂3					
	♂4					
	♀					

Tabulka 6: Princip vyznačení výskytu polymorfí je stejný, jako u tabulky 5. U intronu ve scaffoldu 403 je jediným odlišným jedincem ve skupině samec 4, který byl použit pro testování při vyhledávání polymorfních intronů.

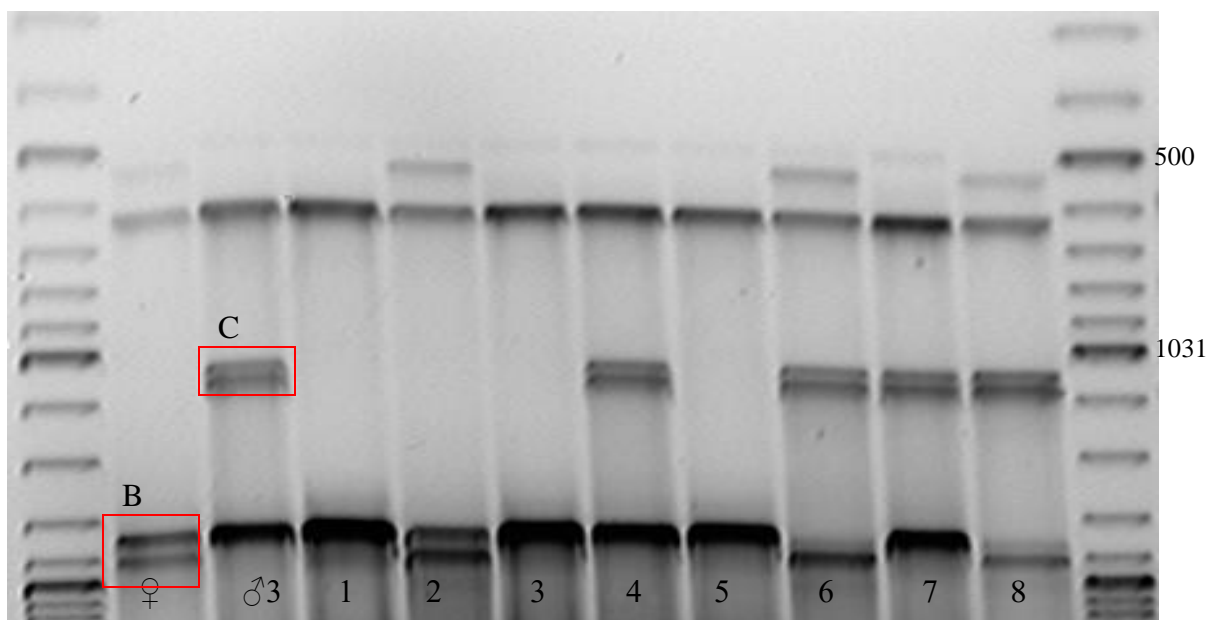
6.7. Křížení



Obrázek 7: Intron ve scaffoldu 219(2), restriktáza *RsaI*. Křížení heteozygotní samice a homozygotního samce, 1-8 potomci. Heteozygotní jsou potomci 2,3,4,5,a 8, homozygotní 1,6 a 7.

Výskyt jednoho nadbytečného bandu je výhodné nejen při hledání heteozygotů, ale i při křížení. Jak ukazuje Obr. 7, je pak velmi snadné zjistit, jak byla děděna heteozygotní alela. V tomto případě je sledován band označený šipkou, který se vyskytuje u samice, samec jej nemá. Tento band, resp. alelu s tímto intronem, zdědilo rovněž pět potomků, zatímco samec a ostatní tři potomci ho nemají. Zpětné křížení homozygota s heteozygotem segreguje v poměru 1:1.

Na druhou stranu není studium křížení vždy tak jednoduché, a to především při křížení dvou heteozygotů. Poměně jednoduchý případ může nastat, jsou-li křížení dva jedinci, kteří mají jednu alelu stejnou a druhou odlišnou (ABxAC). V tomto případě je možné rovněž sledovat výskyt bandů, které se u druhého jedince nenacházejí (viz Obr. 8.) a s tím sledovat i dědění heteozygoních alel. V tomto případě segregují potomci v poměru 1:1:1:1.



Obrázek 8: intron ve scaffoldu 239(2), *HpaII*, 1-8 potomci. Křížení dvou heterozygotů, kteří mají jednu alelu stejnou a druhou odlišnou. Lze sledovat rozchod odlišných alel- u samice je odlišný band „B“ (Spodní z označené dvojice) o velikosti 2600 bází, samec má místo toho skupinu dvou bandů („C“) o velikosti 1100 bází. V potomstvu se vyskytují jak homozygotní jedinci (1,3,5) tak jedinci mající stejný genotyp jako samec (4,7), samice (2) i heterozygotní kombinace obou (6,8).

Poslední možností je křížení heterozygota s heterozygotem. Zvláště při výskytu velkého množství restričních bandů je poměrně obtížné sledovat rozchod alel, proto je výhodné použít restriktázu s menší frekvencí štěpení. Křížení, ve kterém jsou oba rodiče heterozygotní, je vhodné právě pro hledání pohlavního chromozómu, u kterých není známý typ určení pohlaví. Oba dva typy (heterogametní samice či heterogametní samec) je možné hledat s použitím jednoho polymorfního intronu, právě díky možnosti sledování rozchodu všech čtyř alel. Na druhou stranu je právě pro jednoduchost výhodnější buď příklad uvedený na Obr.8, nebo dvou různých zpětných křížení homozygota s heterozygotem.

7. DISKUZE

7.1. Intronové polymorfizmy

Přestože byla existence intronových polymorfizmů známá (MÁCHA et al., 2003), nebyla doposud provedena žádná studie popisující frekvenci jejich výskytu. Intronové polymorfizmy byly doposud studovány pouze z pohledu mutantních genů, které nevykazují mutaci ve své exonové sekvenci (shrnutí v YIP, 2002). Z toho důvodu nebyly intronové polymorfizmy používány jako genetické markery pro vazebné mapování.

Oproti ostatním genetickým markerům mají introny, resp. intronové polymorfizmy výhodu především v hojném výskytu prakticky v celém genomu. Ve srovnání s SSR markery, používanými pro vazebné mapování *X. tropicalis* (<http://tropmap.biology.uh.edu/>), je vysoký výskyt intronů, resp. intronových polymorfizmů prokazatelný, a to i v dosud vazebně nezmapovaných oblastech. Jako genetický marker totiž v tomto případě může sloužit téměř jakýkoli intron o vhodné velikosti. Proto by bylo možné použití intronových polymorfizmů pro oblasti, ve kterých je malé množství jiných objevených markerů, jako je např. krátké raménko LG6 či oblast 1-35 cM v LG 5, ale i dalších.

Nevýhoda použití intronových polymorfizmů v porovnání s AFLP (VOS et al., 1995) a RFLP (GRODZICKER et al., 1974) je nutnost mít sekvenčně zmapovaný genom. Tím je omezeno množství druhů, u kterých je možné tento typ markeru použít. Na druhou stranu u většiny modelových organismů je již genom osekvenován a tudíž toto omezení není tak podstatné (osekvenované genomy na <http://www.ensembl.org/index.html>).

Přestože není každý intron vhodný jako genetický marker, je velmi snadné téměř v každém genu, případně několika blízko sebe ležících genech, takový vhodný intron nalézt. Při použití výše uvedených technik se jako jediné omezení při výběru kandidátního intronu ukázala jeho velikost. Velikost, funkce ani umístění

genu, v němž se introny nacházejí, nemají na jejich možné použití jako genetických markerů žádný vliv.

Je velmi pravděpodobné, že se polymorfizmy nacházejí i v intronech mimo velikostní interval 2-5 Kbp a tudíž by mohla být technika s menšími úpravami použita i pro větší, resp. menší introny. Kromě použití jednoho specifického intronu lze rovněž použít dva, případně i více intronů s vloženými exony. Tento fakt značně rozšiřuje možnosti použití techniky, a to především případě, kdy je jako marker nutné použít konkrétní gen, resp. jeho intron či introny.

Pro testování intronových polymorfizmů byly použity tři často štěpící restriktázy: MboI, HpaII a RsaI. Přestože se v případě restriktáz HpaII a RsaI vyskytovaly polymorfie ve větším množství případů, není možné tento závěr zobecnit. Rovněž je možné použití dalších, méně často štěpících restriktáz.

Restrikcí intronů je možné identifikovat rozdíly mezi jedinci především v mutacích v restričních místech, jako jsou bodové mutace, inserce, delece, případně nový vznik takových restričních míst. Dobře jsou identifikovatelné také délkové mutace mezi dvěma restričními místy, které ovšem musí být natolik velké, aby je bylo možné identifikovat na agarózovém gelu. Nejjednodušší případ nastává při výskytu dvou odlišně velkých alel jednoho intronu, v tomto případě odpadá nutnost restričního štěpení.

Nalezení intronových polymorfizmů je s použitím výše použitých technik velmi jednoduché, levné, rychlé a opětovně reprodukovatelné. Značnou výhodou je možnost použití jako genetických markerů geny, resp. jejich introny, které již byly vazebně mapovány, případně libovolné jiné. Okrajové exonové sekvence zaručují unikátnost PCR produktu, kterou je navíc možné zkontrolovat v genových databázích. Rovněž výhodné je rozšíření techniky větším množstvím restriktáz či použití různě koncentrovaných agarózových gelů. S výhodou lze také použít rychle štěpící restriktázy, které i tak poměrně rychlé testování ještě zrychlí.

Kromě použití intronových polymorfii ve vazebném mapování by je bylo možné použít jako alternativní markery při určování paternity. Vysoký výskyt

intonových polymorfizmů lze očekávat nejen u druhu *Xenopus tropicalis*, ale kvůli vysoké mutabilitě intronů obecně u všech druhů, včetně člověka.

7.2. Využití intronových polymorfizmů při hledání typu určení pohlaví

Typ určení pohlaví u druhu *Xenopus tropicalis* nebyl doposud zjištěn. Zatímco studie provedené na příbuzném druhu *Xenopus laevis* jasně ukazují, že má tento druh heteogametické samičí pohlaví (typ určení pohlaví Abraxas), výzkumy udělané na druhu *X. tropicalis* v různých laboratořích se liší. Všeobecně se spíše předpokládá, že má *X. tropicalis* určení pohlaví stejné, jako *X. laevis*, výsledky potvrzující tuto teorii jsou na druhou stranu značně kontroverzní. Dr. Lyle Zimmerman má výsledky, které naznačují spíše učení pohlaví typu Abraxas (osobní sdělení), zatímco laboratoř Dr. Roba Graingera tvrdí opak (osobní sdělení).

U *X. laevis* byl zjištěn typ určení pohlaví pomocí metody gynogeneze (TOMPKINS et al., 1978). Touto metodou jsou produkovány diploidní embrya nesoucí pouze maternální genom. Oocyty jsou oplozeny spermii ozářenými UV, kdy dojde k fatálnímu poškození genetického materiálu. Jejich schopnost zahájit následný vývoj embrya je ale zachována. Působením vysokého tlaku nebo tepelným šokem je zabráněno vyloučení druhého pólového tělíska, čímž je zajištěna diploidizace embrya. Pokud by byla samice homogametní (XX), v potomstvu by se vyskytovaly pouze samice (XX). V případě *X. laevis* bylo potomstvo částečně neživotaschopné (WW). Zbytek tvořili pouze samci (ZZ). Tímto způsobem bylo dokázáno, že je samice heterogametní (ZW).

Princip metody gynogeneze je jednoduchý, na druhou stranu není technika aplikovatelná na všechny živočišné druhy. Zatímco u *X. laevis* ji bylo možné pro určení typu pohlaví použít, u *X. tropicalis* se to zatím nikomu nepodařilo. Hlavním důvodem je hromadění recesivních mutací u gynogenetických jedinců, kteří buď nejsou životaschopní vůbec, nebo nedorostou do takové velikosti, aby u nich mohlo být zcela jistě určeno pohlaví (NORAMLY et al, 2005). Rozdílné výsledky o typu

určení pohlaví mohou být způsobeny nesprávnou identifikací pohlaví u nedospělých jedinců.

Na druhou stranu je možné, že má *X. tropicalis*, stejně jako *Rana rugosa*, oba dva typy určení pohlaví, lišící se podle původu použitého kmenu (MIURA et al., 1998). Pak by mohlo být určení pohlaví zjištěné ve dvou různých laboratořích skutečně odlišné.

Z pohledu identifikace pohlavních chromozómu u *X. tropicalis* byla v rámci mé diplomové práce navrhována nová metoda. Ta umožňuje sledovat vazbu genu určujícího pohlaví a genetického markeru (intronového polymorfizmu). Fenotypový projev genu určujícího pohlaví je u dospělých jedinců snadno identifikovatelný, proto je možné sledovat vazbu markeru fenotypového s genetickým. Genetické markery nalezené v rámci diplomové práce jsou od sebe vzdálené 20 centimorganů. Tato vzdálenost by měla být dostatečná pro prokázání vazby dvou genetických markerů (R. GRANGER, osobní sdělení). Vzhledem k tomu, že není do současné doby známý typ určení pohlaví (heteogametická samice nebo samec ?), bylo třeba nalézt vhodné markery pro obě možnosti, případně marker, který je splňuje zároveň. Tuto podmínku nejlépe splňují markery, které jsou u obou pohlaví heterozygotní, s jednou alelou stejnou a druhou odlišnou (ABxAC).

Pro hledání vazby genetického markeru s fenotypovým projevem neznámého genu by bylo možné použít i jiné markery- např. SSR. Zjednodušila by se tím především práce s navrhováním primerů, ovšem neodpadla by nutnost otestovat rodiče pro heterozygotnost. Značnou výhodou intronových markerů je však unikátní amplifikace z exonových sekvencí, což nelze s jistotou tvrdit u SSR markerů. Navíc jeden vazebně lokalizovaný scaffold většinou poskytuje dostatečné množství intronů, které mohou jako markery sloužit.

Kromě hledání genu určujícího pohlaví je možné tuto techniku použít k hledání libovolného genu se snadno identifikovatelným fenotypovým projevem.

7.3. Pohlavní chromozóm a gen určující pohlaví

Kandidátní vazebné skupiny určující pohlaví jsou tři: LG 5 pro svou velkou syntenií s lidským chromozómem X, LG6 kvůli vazebně nezmapovanému krátkému raménku a menším synteniím s lidským chromozómem X a LG 7, která má velký rozdíl mezi skutečnou a vazebnou délkou a rovněž nesrovnalosti mezi vazebnou a fyzickou mapou (V. KRYLOV, osobní sdělení). Podobné výsledky, tedy velký rozdíl mezi fyzickou a vazebnou mapou a malé zastoupení vazebných markerů vykazuje např. samčí pohlavní chromozóm u ryby Medaka (KONDO et al., 2001). Na základě podrobné vazebné mapy bylo možné u tohoto modelu nalézt i gen určující pohlaví (MATSUDA et al., 2002; NANDA et al., 2002).

Vazebná mapa *X. tropicalis* zatím s určitostí nevykazuje jedno místo se zakázanou rekombinací, respektive vazebně nezmapovaných míst je několik. Kromě toho může být vazebná nezmapovanost některých oblastí genomu zapříčiněna malým zastoupením zvolených vazebných markerů.

Protože gen určující pohlaví může být i úplně jiný, než jsou kandidátní geny, je pro jeho hledání výhodnější vazebné mapování než testování jednotlivých kandidátních genů. Určení vazby na pohlaví je jediný způsob, jak s jistotou identifikovat gen určující pohlaví.

8. ZÁVĚR

Svou studií jsem potvrdila možné použití intronových polymorfií jako genových markerů při vazebném mapování i při hledání genů určujících pohlaví.

1. Identifikovala jsem tři kandidátní pohlavní chromozómy, resp. vazebné skupiny u *Xenopus tropicalis* (Chr. 10 - LG5, Chr. 2 - LG6 a Chr. 3 - LG7)
2. V rámci kandidátních vazebných skupin jsem našla introny o velikosti 2-3,5 kbp, vhodných jako genové markery
3. Identifikovala jsem tři restriktazy poskytující dostatečné množství intronových polymorfií
4. Ve zvolených vazebných skupinách jsem našla intronové polymorfizmy vhodné pro vazebné mapování
5. Provedla jsem křížení vybraných jedinců a založila F1 generaci

9. CITOVANÁ LITERATURA

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*; 215:403–10.
2. Amaya E, Offield MF, Grainger RM. (1998): Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends Genet.* Jul;14(7):253-5.
3. Armour JA, Harris PC, Jeffreys AJ. (1993): Allelic diversity at minisatellite MS205 (D16S309): evidence for polarized variability. *Hum Mol Genet.* Aug;2(8):1137-45.
4. Armour JA, Harris PC, Jeffreys AJ.: Allelic diversity at minisatellite MS205 (D16S309): evidence for polarized variability. *Hum Mol Genet.* 1993 Aug;2(8):1137-45.
5. Ayoama R, Hiruma E, Sasaki H. (2003): Effects of creatine loading on muscular strength and endurance of female softball players. *J Sports Med Phys Fitness.* Dec;43(4):481-7.
6. Bellerby, C.W. (1934.): A rapid test for the diagnosis of pregnancy. *Nature.* 133: 494–495.
7. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. (1989): Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods.* Dec 20;125(1-2):279-85.
8. Brooks LD, Marks RW. (1986): The organization of genetic variation for recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* Oct;114(2):525-47.
9. Bull JJ. (1987): Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. *Experientia Suppl.*;55:93-115
10. Cannatella D.C., de Sa R.O. (1993): *Xenopus laevis* as a model organism. *Syst. Biol.* 42:476-507

11. Cederberg H, Agurell E, Hedenskog M, Rannug U. (1993): Amplification and loss of repeat units of the human minisatellite MS1 integrated in chromosome III of a haploid yeast strain. *Mol Gen Genet.* Apr; 238(1-2):38-42.
12. Cinti C, Santi S, Maraldi NM. (1993): Localization of single copy gene by PRINS technique. *Nucleic Acids Res.* Dec 11;21(24):5799-800
13. Clark MS (1999): Comparative genomics: the key to understanding the Human Genome Project. *Bioessays*;21:121–30
14. Cohen DR, Sinclair AH, McGovern JD. (1994): SRY protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 10;91(10):4372-6.
15. de Sá RO, Hillis DM. (1990): Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol Biol Evol.* Jul;7(4):365-76.
16. De Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Boizet B, Berta P (1998): Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone receptor. *J Biol Chem* 273:29654–29660
17. Delbridge ML, Lingenfelter PA, Disteché CM, Graves JA. (1999): The candidate spermatogenesis gene RBMY has a homologue on the human X chromosome. *Nat Genet.* Jul;22(3):223-4
18. Dichmann DS, Fletcher RB, Harland RM. (2008): Expression cloning in *Xenopus* identifies RNA-binding proteins as regulators of embryogenesis and RbmX as necessary for neural and muscle development. *Dev Dyn.* Jul;237(7):1755-66.
19. Dubchak I, Brudno M, Loots GG, et al. (2000): Active conservation of noncoding sequences revealed by three-way species comparisons. *Genome Res*;10:1304–6
20. Duellman WE. (1992): Reproductive strategies of frogs. *Sci Am.* Jul;267(1):80-7.

21. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PT, Vogt PH, Chandley AC, Cooke H. (1997): Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15;94(8):3848-53.
22. Erdman SE, Burtis KC. (1993): The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO J*. Feb;12(2):527-35.
23. Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. (1992): SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J*. Dec;11(12):4497-506.
24. Gall JG, Pardue ML. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun;63(2):378-83.
25. Gosden J, Hanratty D, Starling J, Fantes J, Mitchell A, Porteous D (1991): Follicular monitoring and outcome of in vitro fertilization in gonadotropin-releasing hormone-agonist-treated cycles. *Fertil Steril*. Mar;55(3):567-73.
26. Graf JD, Kobel HR (1991).: Genetics of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol*.;36:19-34.
27. Graf JD. (1989): Genetic mapping in *Xenopus laevis*: eight linkage groups established. *Genetics*. Oct;123(2):389-98.
28. Graf JD. (1989): Sex linkage of malic enzyme in *Xenopus laevis*. *Experientia*. Feb 15;45(2):194-6.
29. Graves Marshall JA, Shetty S. (2001): Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool*. Sep 15;290(5):449-62.
30. Grodzicker T, Anderson C, Sharp PA, Sambrook J. (1974): Conditional lethal mutants of adenovirus 2-simian virus 40 hybrids. I. Host range mutants of Ad2+ND1. *J Virol*. Jun;13(6):1237-44.

31. Grützner, F., Ashley, T., Rowell, D. M. And Graves, J. A. M. (2006): How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. *Chromosoma* 115: 75-88.
32. Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y. (2000): Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 16;272(3):662-6. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Nov 2;277(3):781.
33. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1990): A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature.* Jul 19;346(6281):245-50.
34. Haldane, J. B. S., and C. H. Waddington (1931): Inbreeding and linkage. *Genetics* 16: 357–374.
35. Hamilton L. (1963): An experimental analysis of the development of the haploid syndrome in embryos of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol.* Mar;11:267-78
36. Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA (1994): Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 266:1494–1500
37. Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. (2003): The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9. *Endocr Rev.* Aug; 24(4):466-87
38. Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1992): DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science.* Jan 24;255(5043):453-6.

39. Harrer T, Schwinger E, Mennicke K. (2001): A new technique for cyclic in situ amplification and a case report about amplification of a single copy gene sequence in human metaphase chromosomes through PCR-PRINS. *Hum Mutat.* Feb;17(2):131-40.
40. Hawkins JR. (1993): Mutational analysis of SRY in XY females. *Hum Mutat.*;2(5):347-50
41. Herbergs J, Siwek M, Crooijmans RP, Van der Poel JJ, Groenen MA. (1999): Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*). *Anim Genet.* Aug;30(4):274-85.
42. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
43. <http://www.ensembl.org/index.html>
44. <http://frodo.wi.mit.edu/>
45. http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4_info.html
46. <http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html>
47. <http://linkage.rockefeller.edu/soft/>
48. <http://tropicalis/berkeley.edu/home>
49. <http://tropmap.biology.uh.edu/>
50. http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/index.html
51. <http://www.nih.gov/science/models/Xenopus>
52. <http://www.nslj-genetics.org/soft>
53. Chang CY, Witschi E. (1955): Breeding of sex-reversed males of *Xenopus laevis* Daudin. *Proc Soc Exp Biol Med.* May; 89(1):150-2.
54. Chang CY, Witschi E. (1956): Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc Soc Exp Biol Med.* Oct;93(1):140-4
55. Charlesworth B. (1996): The good fairy godmother of evolutionary genetics. *Curr Biol.* Mar 1;6(3):220
56. Charlesworth B. (2002): The evolution of chromosomal sex determination. *Novartis Found Symp.*;244:207-19

58. Charlesworth B, Charlesworth D. (2000): The degeneration of Y chromosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Nov 29;355(1403):1563-72
59. Charlesworth D, Schemske DW, Sork VL. (1987): The evolution of plant reproductive characters; sexual versus natural selection. *Experientia Suppl.*; 55:317-35.
60. Charlesworth D. (2002): Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity.* Feb;88(2):94-101
61. Chiang EF, Pai CI, Wyatt M, Yan YL, Postlethwait J, Chung B (2001): Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol.* Mar 1;231(1):149-63.
62. Jeffreys AJ, Turner M, Debenham P. (1991): The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am J Hum Genet.* May;48(5):824-40.
63. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature.* Mar 7-13;314(6006):67-73.
64. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. (1985): Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature.* Jul 4-10;316(6023):76-9.
65. Jiang J, Gill BS. (2006): Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome.* Sep;49 (9):1057-68.
66. Kadandale JS, Tunca Y, Tharapel AT. (2000): Chromosomal localization of single copy genes SRY and SOX3 by primed in situ labeling (PRINS). *Microb Comp Genomics.*;5(2):71-4.
67. Karl J, Capel B. (1998): Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* Nov 15;203(2):323-33.
68. Khokha MK, Chung C, Bustamante EL, Gaw LW, Trott KA, Yeh J, Lim N, Lin JC, Taverner N, Amaya E, Papalopulu N, Smith JC, Zorn AM, Harland

- RM, Grammer TC. (2002): Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development. *Dev Dyn.* Dec;225(4):499-510.
69. Kimura M, Takahata N. (1983): Selective constraint in protein polymorphism: study of the effectively neutral mutation model by using an improved pseudosampling method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;80(4):1048-52.
70. Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW, Richardson P. (2002): Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn.* Dec;225(4):384-91.
71. Koch JE, Kølvrå S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L. (1989): Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma.* Oct;98 (4):259-65.
72. Kochan KJ, Wright DA, Schroeder LJ, Shen J, Morizot DC. (2003): Genetic linkage maps of the West African clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn.* 2003 Jan;226(1):99-102. Erratum in: *Dev Dyn.* May;227(1):155-6.
73. Komminoth P, Long AA. (1993): In-situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*;64(2):67-73
74. Kondo M, Nagao E, Mitani H, Shima A. (2001): Differences in recombination frequencies during female and male meioses of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*. *Genet Res.* Aug;78(1):23-30.
75. Koopman P, Bullejos M, Bowles J. (2001): Regulation of male sexual development by Sry and Sox9. *J Exp Zool.* Sep 15;290(5):463-74.
76. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* May 9;351(6322):117-21.
77. Kuhl SJ, Tang YJ, Navarro L, Gumerlock PH, Silva J Jr. (1993): Diagnosis and monitoring of *Clostridium difficile* infections with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* Jun;16 Suppl 4:S234-8.

78. Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. (2001): The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet.* Mar;2(3):207-16.
79. Lande R. (1980): Sexual Selection. *Science.* Jul 11;209(4453):268-269
80. Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Baao F, van der Ploeg M. (1987): Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet.* Dec;77(4):366-70.
81. Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987): MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics.* Oct;1(2):174-81.
82. Levi E, Pfeifer WM, Kadin ME. (2001): CD30-activation-mediated growth inhibition of anaplastic large-cell lymphoma cell lines: apoptosis or cell-cycle arrest? *Blood.* Sep 1;98(5):1630-2
83. Lewontin RC. (1964): The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics.* Jan;49(1):49-67. No abstract available.
84. Lichten MJ, Fox MS. (1983): Detection of non-homology-containing heteroduplex molecules. *Nucleic Acids Res.* Jun 25;11(12):3959-71.
85. Lingenfelter PA, Delbridge ML, Thomas S, Hoekstra HE, Mitchell MJ, Graves JA, Disteche CM. (2001): Expression and conservation of processed copies of the RBMX gene. *Mamm Genome.* Jul;12(7):538-45.
86. Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K, et al. (1993): A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell.* Dec 31;75(7):1287-95.
87. Mackill DJ, Zhang Z, Redoña ED, Colowit PM. (1996): Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome.* Oct;39(5):969-77.

88. Mácha J, Tlapáková T, Krylov V, Kopský V (2003): Xstir polymorphism and absence of sex linkage in *Xenopus laevis* ME2 gene. *Folia Biol (Praha)*.;49(3):115-7
89. Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2002): DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*. May 30;417(6888):559-63. Epub 2002 May 12.
90. Mazeyrat S, Saut N, Mattei MG, Mitchell MJ. (1999): RBMY evolved on the Y chromosome from a ubiquitously transcribed X-Y identical gene. *Nat Genet*. Jul;22(3):224-6
91. McCarthy JA, Damoglou AP. (1996): The effect of substrate on the radiation resistance of yeasts isolated from sausage meat. *Lett Appl Microbiol*. Jan;22(1):80-4.
92. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M (1993): A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3368–3372
93. Miura I, Ohtani H, Nakamura M, Ichikawa Y, Saitoh K. (1998): The origin and differentiation of the heteromorphic sex chromosomes Z, W, X, and Y in the frog *Rana rugosa*, inferred from the sequences of a sex-linked gene, ADP/ATP translocase. *Mol Biol Evol*. Dec;15(12):1612-9.
94. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. (1996): Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*. Sep;14(1):62-8.
95. Morton N.E. (1955): Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet* 7: 277-318

96. Mouchel N, Tebbutt SJ, Broackes-Carter FC, et al. (2001): The sheep genome contributes to localization of control elements in a human gene with complex regulatory mechanisms. *Genomics*; 76:9–13.
97. Mural RJ, Adams MD, Myers EW, Smith HO, Miklos GL, Wides R, Halpern A, Li PW, Sutton GG, Nadeau J, Salzberg SL, Holt RA, Kodira CD, Lu F, Chen L, Deng Z, Evangelista CC, Gan W, et al. (2002): A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science*. May 31;296(5573):1661-71. Erratum in: *Science* 2002 Aug 23;297(5585):1278. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1612.
98. Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., et al., 2002. A duplicated copy of DMRT1 in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99, 11778–11783.
99. Nei M. (1969): Linkage modifications and sex difference in recombination. *Genetics*. Nov;63(3):681-99
100. Noramly S, Zimmerman L, Cox A, Aloise R, Fisher M, Grainger RM.(2005): A gynogenetic screen to isolate naturally occurring recessive mutations in *Xenopus tropicalis*. *Mech Dev*. Mar;122(3):273-87
101. Nuovo GJ, Gorgone GA, MacConnell P, Margiotta M, Gorevic PD. (1992): In situ localization of PCR-amplified human and viral cDNAs. *PCR Methods Appl*. Nov;2(2):117-23.
102. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. Nov;5(4):874-9.
103. Orr HA, Kim Y. (1998): An adaptive hypothesis for the evolution of the Y chromosome. *Genetics*. Dec;150(4):1693-8.
104. Ransom DG, Zon LI. (1999): Mapping zebrafish mutations by AFLP. *Methods Cell Biol*.;60:195-211

105. Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. (1999): Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol.* Nov 15;215(2):208-20.
106. Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. (2000): *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* Oct 15;14(20):2587-95.
107. Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D. (1998): Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature.* Feb 12;391(6668):691-5.
108. Rice WR. (1996): Sexually antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature.* May 16;381(6579):232-4.
109. Shapiro, H.A., Zwarenstein, H. (1934): A rapid test for pregnancy on *Xenopus laevis*. *Nature.* 133: 762.
110. Shoemaker CM, Queen J, Crews D. (2007): Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Mol Endocrinol.* Nov;21(11):2750-63. Epub 2007 Aug 7.
111. Scherthan H, Seisenberger C, Greulich K, Winnacker EL. (1994): Mapping of the murine nuclear factor I/X gene (*Nfix*) to mouse chromosome 8 C1-2 by FISH. *Genomics.* Jul 1;22(1):247-9
112. Schlötterer C, Tautz D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* Jan 25;20(2):211-5.
113. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. (2000): Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development.* Jan; 127(1):65-73.
114. Schmid M, Steinlein C. (1991): Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma.* Nov;101(2):123-32.

115. Sibony M, Commo F, Callard P, Gasc JM. (1995): Enhancement of mRNA in situ hybridization signal by microwave heating. *Lab Invest.* Oct;73(4):586-
116. Smith CA, McClive PJ, Western PS, Reed KJ, Sinclair AH. (1999): Conservation of a sex-determining gene. *Nature.* Dec 9;402(6762):601-2.
117. Smith JJ, Voss SR. (2007): Bird and mammal sex-chromosome orthologs map to the same autosomal region in a salamander (ambystoma). *Genetics.* Sep;177(1):607-13. Epub 2007 Jul 29.
118. Soulard M, Della Valle V, Siomi MC, Piñol-Roma S, Codogno P, Bauvy C, Bellini M, Lacroix JC, Monod G, Dreyfuss G, et al. (1993): hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* Sep 11;21(18):4210-7.
119. Southern EM. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* Nov 5;98(3):503-17
120. Speel EJ, Komminoth P. (1999): CARD In Situ Hybridization: Sights and Signals. *Endocr Pathol.* Autumn;10(3):193-198.
121. Sperry A, Jin L, Lloyd RV. (1996): Microwave treatment enhances detection of RNA and DNA by in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol.* Dec;5(4):291-6.
122. Takamatsu N, Kanda H, Ito M, Yamashita A, Yamashita S, Shiba T. (1997): Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene.* Nov 20;202(1-2):167-70.
123. Thiébaud CH, Fischberg M. (1977): DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma.* Feb 3;59(3):253-7.
124. Tlapakova T, Krylov V, Macha J. (2005): Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes. *Chromosome Res.* 2005;13(7):699-706. Epub 2005 Oct 24.
125. Tomkins, R. (1978): Triploid and gynogenetic diploid *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* 203: 251-256.

126. Tsend-Ayush E, O'Sullivan LA, Grützner FS, Onnebo SM, Lewis RS, Delbridge ML, Marshall Graves JA, Ward AC. (2005): RBMX gene is essential for brain development in zebrafish. *Dev Dyn*. Nov;234(3):682-8.
127. Tymowska J, Kobel HR. (1972): Karyotype analysis of *Xenopus muelleri* (Peters) and *Xenopus laevis* (Daudin), Pipidae. *Cytogenetics*. 11(4):270-8.
128. Tymowska J. (1973).: Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Pipidae *Cytogenet Cell Genet*. 12(5):297-304.
129. Via S, Lande R. (1987): Evolution of genetic variability in a spatially heterogeneous environment: effects of genotype-environment interaction. *Genet Res*. Apr;49(2):147-56
130. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. Nov 11;23(21):4407-14.
131. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. Nov 25;18(22):6531-5.
132. Yip SP (2002): Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet*. 2002 Jan;66(Pt 1):1-27.
133. Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. (2008): A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 19;105(7):2469-74. Epub 2008 Feb 11.
134. Youil R, Kemper BW, Cotton RG. (1995): Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 3;92(1):87-91.
135. Zaitseva K, Ohkura Y. (1980): New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. *Anal Biochem*. Nov 15;109(1):109-13